

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Priscilla Maciel Quatrin

Selenocianatos-indólicos como uma nova classe de moléculas antifúngicas

Porto Alegre
2021

Priscilla Maciel Quatrin

Selenocianatos-indólicos como uma nova classe de moléculas antifúngicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Quatrin, Priscilla Maciel
Selenocianatos-indólicos como uma nova classe de
moléculas antifúngicas / Priscilla Maciel Quatrin. --
2021.
197 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Candida spp.. 2. Dermatófitos. 3.
Selenocianatos-indólicos . 4. Infecções fúngicas . I.
Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado em colaboração com diversas pessoas e instituições, que apoiaram em diferentes etapas da pesquisa. Agradeço a todos e em especial:

Ao meu orientador, Prof. Alexandre Fuentefria, por ter confiado em mim, me dando a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, do qual tenho muito orgulho. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos e pela amizade, és um professor inspirador, que desperta o melhor de seus alunos.

Ao Prof. Gustavo Silveira e Prof. Rômulo Canto, responsáveis pelo fornecimento dos compostos de selênio.

Ao Prof. Luis Flávio de Oliveira (in memorian) e seu grupo de pesquisa, pela realização dos ensaios toxicológicos.

Ao Prof. Mário Teixeira, pela realização do ensaio HET-CAM e pela interpretação dos dados.

À Simone Berlitz, pelo auxílio com o preparo das formulações utilizadas no modelo *ex vivo* de onicomiose.

À YARGO Suinocultura, que forneceu a matéria-prima necessária para a padronização do modelo *ex vivo* de onicomiose.

Ao Prof. Saulo Fernandes e à Angélica Rocha, pelo fornecimento das 8-hidroxiquinolinas.

Aos meus colegas de trabalho, em especial à Paula Reginatto, amiga e profissional incrível, sempre disposta a ajudar; Bárbara Costa e Magda Chaves, agradeço pela parceria e pelo auxílio no laboratório; Gabriela Machado, que com a sua sabedoria me auxiliou em muitos momentos; Taís Kaminski, que ingressou comigo no laboratório, agradeço pela parceria; Também agradeço à Daiane Dalla Lana, que me recebeu no laboratório e que me ensinou tanto no início dessa trajetória. Aos demais colegas, Luana Bazana, Ânderson Carvalho e Jade Souza, agradeço por toda a troca de conhecimentos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À minha família, em especial aos meus pais, Gilberto Quatrin e Izaura Maciel e aos meus irmãos, Mylena Quatrin e Gabriel Quatrin, por terem me

proporcionado a oportunidade de estudar, pelo incentivo e por todo o apoio incondicional, que resultaram na concretização do Doutorado. Ao meu companheiro, Ricardo Sá, meu parceiro de vida, que está sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando para eu ir em busca dos meus objetivos. Obrigada por todo o amor, carinho e atenção.

Agradeço aos meus amigos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

Selenocianatos-indólicos como uma nova classe de moléculas antifúngicas

Autor: Priscilla Maciel Quatrin

Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

RESUMO

As infecções fúngicas tornaram-se um problema global de saúde pública, em virtude do aumento no número de pacientes imunocomprometidos, aliado aos relatos frequentes de resistência ao arsenal limitado de antifúngicos disponíveis. Esse cenário estimula a pesquisa por novas opções terapêuticas, tanto para micoses superficiais, quanto sistêmicas. Há um interesse científico crescente pela prospecção de uma nova classe de moléculas antifúngicas, para confrontar o panorama atual das infecções fúngicas. Nesse sentido, esse estudo investigou o potencial antifúngico de uma nova classe de moléculas, conhecida como 3-Selenocianatos-indólicos, frente *Candida* spp. e fungos dermatófitos do gênero *Trichophyton*, *Microsporum* e *Nannizzia*. O *screening* de um conjunto de moléculas da classe dos 3-Selenocianatos-indólicos foi realizado de acordo com os protocolos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008), para determinar a concentração inibitória mínima dos compostos (CIM). Dois compostos destacaram-se, o 4a e 4b, que apresentaram média geométrica de CIM de 4,1 e 6,0 µg/mL contra *Candida* spp. e 1,2 e 2,2 µg/mL contra os dermatófitos, respectivamente, sendo o composto 4a fungicida para *C. albicans* e *T. rubrum*. Os ensaios toxicológicos revelaram que estes compostos não são citotóxicos e nem mutagênicos e, foram classificados como não irritantes pelo teste HET-CAM. Foi verificado um potencial genotóxico dos compostos em concentrações elevadas, observado pelo ensaio cometa, que pode ser sugestivo de um mecanismo de ação direcionado para o núcleo das células fúngicas. Nesse estudo também foi padronizado um modelo *ex vivo* de onicomicose utilizando cascos suínos, para avaliar o desempenho pré-clínico de formulações tópicas. Por esse modelo foi possível verificar a atividade antifúngica do composto 4a e da terbinafina, ambos incorporados em uma base de esmalte comercial, que inibiram completamente o crescimento de *T. rubrum*, fungo prevalente em onicomicoses. Com esses resultados pré-clínicos, concluímos que a classe dos 3-Selenocianatos-indólicos é promissora e atrativa para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, pela sua ação de amplo espectro, para o tratamento de micoses sistêmicas e superficiais.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (197 p.) agosto, 2021.

Selenocyanate-indoles as a new class of antifungal molecules

Author: Priscilla Maciel Quatrin

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

ABSTRACT

Fungal infections have become a global public health problem due to the increase in the number of immunocompromised patients, combined with frequent reports of resistance to the limited arsenal of available antifungals. This scenario encourages the search for new therapeutic options, both for superficial and systemic mycoses. There has been an increasing scientific interest in prospecting a new class of antifungal molecules, to confront the current panorama of fungal infections. In this sense, this study investigated the antifungal potential of a new class of molecules, known as indole 3-Selenocyanate-indoles, against *Candida* spp. and dermatophyte fungi of the genus *Trichophyton*, *Microsporum* and *Nannizzya*. The screening of a set of 3-Selenocyanate-indoles molecules was performed according to protocols M27-A3 and M38-A2 (CLSI, 2008), to determine the minimum inhibitory concentration of the compounds (MIC). Two compounds stood out, 4a and 4b, which presented geometric mean MIC of 4.1 and 6.0 µg/mL against *Candida* spp. and 1.2 and 2.2 µg/ml against dermatophytes, respectively, being the 4a fungicide for *C. albicans* and *T. rubrum*. Toxicological tests revealed that these compounds are neither cytotoxic nor mutagenic and were classified as non-irritating by the HET-CAM test. A genotoxic potential of the compounds at high concentrations was verified, observed by the comet assay, which may be suggestive of a mechanism of action directed to the fungal cell nucleus. In this study, an *ex vivo* model of onychomycosis using porcine hoofs was also standardized to assess the preclinical performance of topical formulations. Through this model, it was possible to verify the antifungal activity of compound 4a and terbinafine, both incorporated in a commercial enamel base, which completely inhibited the growth of *T. rubrum*, a fungus prevalent in onychomycosis. With these preclinical results, we conclude that the 3-selenocyanate-indoles class is promising and attractive for the development of new antifungal drugs, due to its broad spectrum action, for the treatment of systemic and superficial mycoses.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (197 p.) august, 2021.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Infecções causadas por <i>Candida</i> spp. e opções terapêuticas	4
3.2	Infecções causadas por fungos dermatófitos e opções terapêuticas ...	8
3.3.	Onicomicose.....	14
3.4.	Mecanismo de ação dos antifúngicos e novos alvos terapêuticos ...	20
3.5.	Mecanismos de resistência aos antifúngicos.....	26
3.6.	Modelos alternativos de infecções fúngicas.....	31
3.7.	Compostos organoselênio.....	33
3.8.	Derivados indólicos.....	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Locais de realização da pesquisa.....	36
4.2.	Seleção dos fungos de interesse.....	36
4.3.	Obtenção dos 3-Selenocianatos-indólicos.....	36
4.4.	Ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos.....	37
4.5.	Mecanismo de ação.....	38
4.5.1.	Ligação ao ergosterol exógeno.....	38
4.5.2.	Ensaio de proteção do sorbitol.....	39
4.6.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
4.7.	<i>Time-kill</i>	40
4.8.	Toxicidade.....	41
4.9.	Teste em membrana corioalantoica de ovo de galinha (HET-CAM)...	42
4.10.	Padronização de modelo de onicomicose.....	43
4.10.1.	Formulações antifúngicas utilizadas no experimento.....	43
4.10.2.	Preparo dos discos de cascos suínos.....	43
4.10.3.	Infecção fúngica <i>ex vivo</i> em casco suíno.....	43
4.10.4.	Análise estatística	44
4.11.	Modelo <i>ex vivo</i> de infecção fúngica em pele suína.....	44

5.	ARTIGOS	46
5.1.	Artigo 1	46
5.2.	Artigo 2	66
5.3.	Artigo 3.....	102
5.4.	Artigo 4.....	114
5.5.	Resultados não apresentados na forma de artigo	124
6.	DISCUSSÃO GERAL	126
7.	CONCLUSÃO	139
8.	REFERÊNCIAS	141
9.	APÊNDICES	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais classes de antifúngicos e seus alvos celulares.....20

Tabela 2: Antifúngicos tópicos indicados para dermatofitoses.....20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micromorfologia da cultura do <i>T. rubrum</i>	10
Figura 2: Micromorfologia da cultura de <i>T. mentagrophytes</i>	11
Figura 3: Dermatofitoma em paciente com onicomicose subungueal lateral distal.....	15
Figura 4: Onicomicose associada à <i>Tinea pedis</i>	15
Figura 5: Subtipos de onicomicose.....	17
Figura 6: Alvos antigos e novos como candidatos a ação dos antifúngicos.....	25
Figura 7: Mecanismos de resistência aos antifúngicos encontrados em fungos.....	30
Figura 8: Estados de oxidação do selênio.....	33
Figura 9: Requisitos estruturais para obtenção de agentes antimicrobianos derivados do indol.....	35
Figura 10: Processo infeccioso do <i>T. mentagrophytes</i> em pele suína....	124
Figura 11: Contagem de UFC/mL após o tratamento com o composto 4a e com o Miconazol em creme (Vodol).....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMD	Exame Micológico Direto
FDA	Food and Drug Administration
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDA	Potato Dextrose Ágar
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
UFC	Unidade Formadora de Colônia

1. INTRODUÇÃO

Estimativas indicam que mais de 300 milhões de pessoas são afetadas por infecções fúngicas graves, resultando na morte anual de mais de um milhão de pessoas no mundo, principalmente pelo número crescente de pacientes imunocomprometidos. A supressão imunológica resultante de doenças como a AIDS, de tratamentos quimioterápicos contra o câncer, de terapias imunossupressoras realizadas em transplantados, além da corticoterapia, são fatores relacionados com o aumento significativo no número de infecções fúngicas oportunistas, que englobam desde infecções mucocutâneas até infecções sistêmicas, com risco elevado de mortalidade. Aliado a isso, os relatos frequentes de resistência à terapia antifúngica disponível comprometem o manejo clínico das micoses agudas e crônicas, em função do uso indiscriminado dos agentes antifúngicos.

Entre os fungos associados com infecções sistêmicas que podem ser fatais, há um destaque para as espécies de *Candida*, em especial a *C. albicans*, que também são responsáveis por causar infecções superficiais, como a onicomicose e infecções em mucosas. Várias espécies de *Candida* são oportunistas, causando infecções em imunocomprometidos, quando há um desequilíbrio na homeostase dos tecidos. Os azóis e as equinocandinas são opções terapêuticas utilizadas globalmente no tratamento de infecções causadas por estas leveduras, entretanto, os relatos de resistência a esses antifúngicos são crescentes e os efeitos já podem ser observados na clínica.

Por outro lado, os fungos dermatófitos são a causa mais comum de infecções fúngicas superficiais, pois são queratinofílicos, ou seja, possuem a capacidade de infectar e degradar tecidos queratinizados como a pele, a unha e o cabelo. Em relação aos principais agentes etiológicos da dermatofitose humana no mundo, há um destaque para o *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*. Entre eles, *T. rubrum* é o prevalente, pois é isolado entre 50-80% dos casos, especialmente em onicomicoses.

O arsenal de antifúngicos atualmente disponível é limitado, e inclui os polienos, azóis, alilaminas, equinocandinas e flucitosina. À vista disso, torna-

se imprescindível a pesquisa por novos compostos que sejam efetivos para combater as infecções fúngicas. O selênio é um oligoelemento que desempenha um importante papel em diversas funções biológicas do organismo, como na defesa antioxidante, na síntese de hormônios tireoidianos, síntese de DNA, entre outras funções. Muitos compostos organoselênio com diferentes grupos funcionais foram descritos na literatura, incluindo selenocianatos, selenoureias, selenoésteres, selenetos, disselenídeos e nanopartículas de selênio, com potencial antimicrobiano. Os indóis também possuem diversas propriedades farmacológicas, com destaque para sua ação antimicrobiana e, por esse motivo, os derivados indólicos sintéticos vêm sendo projetados em muitos estudos. Além disso, possuem uma arquitetura molecular que é atrativa para a projeção de novos compostos de interesse medicinal. Aliar as propriedades farmacológicas do selênio e dos indóis pode ser uma opção promissora na busca por novas moléculas antifúngicas eficientes.

Portanto, o número restrito de antifúngicos disponíveis, aliado a um número crescente de infecções fúngicas, bem como aos relatos de resistência e toxicidade dos antifúngicos atuais, expõe a necessidade urgente de desenvolvimento de novas classes de antifúngicos. Assim, através deste trabalho, foi possível verificar de forma pré-clínica que a nova classe dos 3-Selenocianatos-indólicos é candidata promissora a novos antifúngicos, por apresentar uma ação de amplo espectro contra leveduras e fungos dermatófitos, tornando-se uma classe de moléculas atrativa para o desenvolvimento de novos fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica, citotóxica e genotóxica dos 3-Selenocianatos-indólicos frente a *Candida* spp. e fungos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Nannizzia*, bem como a padronização de modelos *ex vivo* de infecções fúngicas, para verificar a ação tópica dos agentes antifúngicos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Selecionar os compostos de selênio com atividade antifúngica;

2.2.2. Determinar a toxicidade dos compostos selecionados em linfócitos humanos através de testes *in vitro* e o potencial irritante através de testes *in vivo*;

2.2.3. Análise do mecanismo de ação dos compostos selecionados através de ensaios com ergosterol e sorbitol;

2.2.4. Determinar a relação concentração e tempo de morte celular, bem como o perfil fungicida ou fungistático dos compostos selecionados;

2.2.5. Padronizar um modelo *ex vivo* de onicomicose utilizando casco suíno, para verificar a ação de antifúngicos tópicos de forma pré-clínica;

2.2.6. Avaliar a atividade antifúngica do composto mais efetivo inserido em uma base de esmalte, utilizando o modelo *ex vivo* de onicomicose;

2.2.7. Padronizar um modelo *ex vivo* de infecção em pele, utilizando a orelha suína, para verificar de forma pré-clínica a ação de antifúngicos tópicos;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Infecções causadas por *Candida* spp. e opções terapêuticas

As leveduras do gênero *Candida* estão envolvidas com casos graves de doenças fúngicas, sendo a *C. albicans* o principal agente causador de infecções em mucosas. Essa espécie também está associada com a maioria dos casos de candidíase invasiva nosocomial no mundo, além de infecções superficiais como a candidíase orofaríngea em pacientes imunocompetentes (Pfaller & Diekema, 2010; Guinea, 2014). Muitas espécies de *Candida* são endossimbiontes dos seres humanos e causam infecções principalmente em pacientes que possuem o sistema imunológico debilitado. Esse comprometimento imunológico, aliado ao aumento no número de procedimentos médicos invasivos, são fatores importantes que estão relacionados com os casos frequentes de infecção por *Candida* spp.

Segundo o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) essas leveduras representam uma séria ameaça a saúde humana, em razão do aumento dramático da resistência aos antifúngicos (CDC, 2013). As espécies de *Candida* que residem em hospedeiros saudáveis e que causam infecções oportunistas são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (Spampinato & Leonardi, 2013).

A *C. albicans* é responsável por cerca de 80% das candidíases, entretanto, um aumento crescente de infecções causadas por *Candida* não-*albicans* vem sendo observado, em especial por *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, além de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. auris* (Schelenz, et al., 2016; Friedman & Schwartz, 2019). Altas taxas de mortalidade estão relacionadas com essas infecções, variando entre 20% e 60%, dependendo dos fatores de risco de cada paciente (Calderone & Clancy, 2012). Os fatores de risco relacionados com a candidíase invasiva englobam os procedimentos cirúrgicos (em especial a cirurgia abdominal), queimaduras, internação prolongada em unidade de terapia intensiva, administração de antibióticos de amplo espectro e de agentes imunossupressores (Sydnor & Perl, 2011).

A *C. albicans* apresenta grande versatilidade ao se transformar de um microrganismo comensal inofensivo em um patógeno. Sua virulência está relacionada com sua capacidade de expressar moléculas de superfície como

adesinas, formar biofilmes, secretar enzimas hidrolíticas, alterar sua morfologia, além de possuir uma adaptabilidade metabólica. Tais fatores de virulência possibilitam uma rápida adaptação da levedura em diferentes nichos do hospedeiro, causando infecções em pacientes comprometidos, pela utilização de antibioticoterapia, ou com o sistema imunológico debilitado (Ciurea et al., 2020). Estes microrganismos desenvolveram estratégias de evasão para escapar do sistema imunológico. As células do sistema imunológico podem reconhecer o polissacarídeo β -glicano da parede celular, porém o β -glicano é protegido na camada externa de manoproteína presente na parede celular, enganando dessa forma os mecanismos de reconhecimento do hospedeiro (Höfs, Mogavero & Hube, 2016).

As células leveduriformes podem ser encontradas de formas diferenciadas, como células de levedura de brotamento unicelular ou formas filamentosas, como hifas ou pseudo-hifas, que desempenham funções distintas no processo infeccioso (Gow, Brown & Odds, 2002). Pseudo-hifas são caracterizadas como cadeias de células que não sofreram separação nas junções entre as células. Em contrapartida, as hifas verdadeiras são divididas por septos (Tang et al., 2016). As diferentes espécies de *Candida* podem sofrer uma transição morfológica reversível que possibilita uma melhor penetração na barreira epitelial do hospedeiro (Ciurea et al., 2020). A formação de hifas é considerada um fator de virulência, pois facilita o processo de invasão durante a infecção pela perfuração das células do hospedeiro (Dalle et al., 2010). *C. glabrata* não forma hifas, então para colonizar e causar infecções, é necessária uma brecha nas barreiras naturais do hospedeiro. Essa invasão pode acontecer de forma acidental ou iatrogênica (Silva et al., 2012).

O número de casos de pacientes com candidemia entre os continentes apresentam diferenças importantes. A maioria dos casos mundialmente reportados ocorrem na Ásia (cerca de 50%), seguido pelas Américas, Europa e África. Essas incidências estão relacionadas com o compromisso dos sistemas de saúde de cada região, escasses de recursos, controle de infecção inadequado, diagnóstico errôneo pelo uso excessivo de terapia empírica e pouco conhecimento sobre as infecções fúngicas (Kaur & Chakrabarti, 2017).

A candidíase vulvovaginal, que é caracterizada pela infecção da mucosa genital, ocorre entre 70-75% das mulheres em idade reprodutiva. A taxa de recidiva ocorre entre 40-50% das pacientes e aproximadamente 5-8% desenvolvem candidíase vulvovaginal recorrente, caracterizada por quatro ou mais episódios de infecção num período de 12 meses. Entre as espécies de *Candida*, a *C. albicans* é a mais prevalente (70-90%) (Beikert et al., 2011; Dias et al., 2011; Sobel, 2007).

O clotrimazol é um imidazol muito utilizado como tratamento tópico em casos de candidíase vulvovaginal, desde a década de 1960, e por ser um antifúngico da classe dos azóis, sua ação antimicótica envolve a inibição da síntese do ergosterol, ocasionando dano estrutural e funcional na membrana celular (Crowley & Gallagher, 2014). Problemas de toxicidade ou de biodisponibilidade limitam a utilização da maioria dos imidazóis, sendo então formulados apenas para uso tópico. Os únicos agentes antifúngicos da classe dos azóis utilizados em infecções sistêmicas são os triazóis, que incluem o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol (Ostrosky-Zeichner et al., 2010; Miceli & Kauffman, 2015). O fluconazol foi aprovado em 1994 como tratamento oral de dose única para a candidíase vulvovaginal. Também é eficaz para o tratamento de candidíase orofaríngea e esofágica, peritonite, bem como candidíase disseminada (Asha, 2000).

A natureza fungistática dos azóis impõe uma forte seleção de fungos patogênicos que podem evoluir para a resistência ao tratamento. Além disso, espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsicamente menos suscetíveis a essa classe de antifúngicos (Robbins, Wright & Cowen, 2016). Nesse contexto de resistência aos azóis, as equinocandinas surgiram como uma importante opção terapêutica contra a candidíase. Essa é a única classe de antifúngicos que chegou no mercado farmacêutico em décadas, com três equinocandinas atualmente disponíveis para uso clínico: caspofungina, micafungina e anidulafungina (Robbins, Wright & Cowen, 2016). A grande vantagem dessa classe de antifúngicos é o perfil de segurança para administração clínica, provavelmente pelo alvo específico inexistente em mamíferos, a parede celular fúngica (Denning, 2003).

Grande parte das infecções causadas pelas diferentes espécies de

Candida são resultado da formação de um biofilme, caracterizado pela presença de um grupo de microrganismos envoltos por uma matriz extracelular, que serve como uma barreira para a penetração dos antifúngicos, formando uma estrutura tridimensional em superfícies bióticas ou abióticas (Harriott et al., 2010). Estudos indicam a presença de resistência desses biofilmes à anfotericina B e ao fluconazol na clínica e em ensaios *in vitro* (Perlin, Rautemaa-Richardson & Alastruey-Izquierdo, 2017). Dispositivos implantados e os tecidos dos hospedeiros podem ser colonizados por *Candida* spp., causando infecções. Estudos relatando a formação de biofilme por *C. albicans*, demonstram um perfil de resistência aos antifúngicos de até 1000 vezes maior em comparação com células *in vitro*, sem biofilme (Wisplinghoff et al., 2004; Harriott et al., 2010).

A *C. glabrata* é frequentemente envolvida em relatos de resistência em hospitais, e é a segunda mais frequente isolada em infecções causadas por *Candida*. Junto com a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, são as três espécies mais frequentemente envolvidas com a candidíase oral (Silva et al., 2012). Mesmo sem a capacidade de mudar de levedura para hifas, a *C. glabrata* possui importantes fatores de virulência incluindo a formação de espessos biofilmes, que contribuem para a sua patogenicidade (Rodrigues et al., 2017). A *C. glabrata* é menos suscetível aos antifúngicos azóis e, muitos isolados resistentes ao fluconazol causam septicemia (Pfaller et al., 2012).

Em relação às infecções por *C. parapsilosis*, observa-se um aumento recente no número de casos, sendo um problema importante entre os recém-nascidos e em pacientes receptores de transplantes ou que recebem nutrição parenteral (Silva et al., 2012). Essa espécie também é isolada com frequência nas mãos dos profissionais de saúde, facilitando a dispersão pelo ambiente hospitalar, gerando surtos de infecção (Silva et al., 2012). Como essa espécie possui a capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos, além de colonizar materiais protéticos e dispositivos intravasculares, bem como secretar enzimas hidrolíticas e sofrer troca fenotípica, os surtos hospitalares são frequentes, com altas taxas de mortalidade (Neji et al., 2017). Infecções por *C. tropicalis* são comumente observadas em pacientes com neutropenia e malignidade hematológica. Os fatores de virulência dessa espécie incluem a

potente adesão às células epiteliais e endoteliais bucais, secreção de enzimas líticas (proteínases, fosfolipase, hemolisinas), bem como a troca fenotípica. Além disso, é uma espécie fortemente produtora de biofilme (Silva et al., 2012). É importante ressaltar que a *C. tropicalis* possui expressiva resistência ao fluconazol (Zuza-Alves, Silva-Rocha & Chaves, 2017).

Os relatos de resistência cada vez mais frequentes observados para *Candida* spp. resultam em um risco mais elevado de infecções e o impacto dessas cepas resistentes à terapia disponível é uma preocupação global de saúde pública. Esse fato pode estar relacionado com o prognóstico ruim para os pacientes e com infecções recorrentes, além do aumento dos custos com os cuidados de saúde (Pfaller, 2012).

3.2. Infecções causadas por fungos dermatófitos e opções terapêuticas

Infecções superficiais conhecidas como dermatofitoses ou *tineas*, são causadas por fungos dermatófitos que apresentam como principal característica uma alta afinidade por estruturas queratinizadas presentes nas unhas, na pele e no cabelo (Gnat, Nowakiewicz & Ziezba, 2019). Esses fungos são divididos em três grupos ecológicos: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos. Os geofílicos geralmente são saprofíticos e raramente causam infecções em animais e humanos. Os zoofílicos vivem em estreita associação com os animais e podem causar infecções em humanos. Os antropofílicos infectam os seres humanos, que são os hospedeiros primários, mas também podem causar infecções em animais (de Hoog et al., 2017).

Entre as *tineas*, a *Tinea corporis* (pele glabra), *Tinea pedis* (pés), *Tinea cruris* (virilha) e *Tinea unguium* (unhas) são as predominantes em seres humanos (Lakshmiathy & Kannabiran, 2010). Demais *tineas* incluem a *Tinea barbae* (rosto e pescoço), *Tinea capitis* (couro cabeludo, cílios e sobrancelhas), *Tinea favosa* (cabelo e pele) e *Tinea manuum* (mão) (Lopes, Tavarina & Pintado, 2020). A prevalência dessas infecções está aumentando nos últimos anos, em especial nos países tropicais, tornando-se um problema de saúde mundial (Sahoo & Mahajan, 2016; Köhler et al., 2017).

Os dermatófitos são divididos em sete gêneros: *Trichophyton* spp.,

Epidermophyton sp., *Nannizzia* spp., *Paraphyton* spp., *Lophophyton* sp., *Microsporium* spp. e *Arthroderma* spp. (Lopes, Tavaría & Pintado, 2019) *T. rubrum* é a espécie patogênica mais frequentemente relatada em casos de dermatofitose, entretanto, há uma tendência crescente de infecções ocasionadas por *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* (Dabas et al., 2017; Rudramurthy et al., 2018; Singh et al., 2018). Nas Américas, *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* são as espécies mais frequentemente isoladas nessas regiões (Nweze & Eke, 2017).

O *T. rubrum* é um fungo antropofílico, a palavra *rubrum* (do latim: vermelho), refere-se à pigmentação marrom-avermelhada que pode ser visualizada no reverso da cultura. Esse fungo raramente afeta o cabelo ou a raiz do cabelo, sendo o estrato córneo da epiderme e a queratina das unhas o alvo desses dermatófitos (Nenoff et al., 2014). A morfologia de *T. rubrum* pode apresentar variações, por exemplo, a superfície da cultura pode ser penugenta ou semelhante à camurça; a pigmentação da cultura pode variar entre branco a creme e vermelho escuro; a pigmentação do reverso pode variar de incolor a amarelado, amarelo-marrom a vermelho-vinho. Em relação aos microconídios, podem estar ausentes, escassos ou em muita quantidade; a forma também pode variar, de clavado delgado a piriforme; os macroconídios podem ser ausentes, ou podem variar de escassos a muitos (The University of Adelaide, 2016). Na Figura 1 é possível visualizar a micromorfologia da cultura do *T. rubrum*, contendo microconídios em forma de arame farpado.



Figura 1: Micromorfologia da cultura do *T. rubrum*.

Fonte: Fuentefria et al. (2019).

Já o *T. mentagrophytes*, fungo zoofílico, destaca-se como o segundo agente causador mais prevalente de dermatomicoses. A taxonomia desse fungo sofreu várias mudanças nos últimos anos, sendo que hoje em dia, cinco espécies fazem parte do complexo *T. mentagrophytes*: *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. erinacei*, *T. quinckeanum* e *T. benhamie*, sendo as características microscópicas dessas espécies praticamente idênticas (Frías-De-León et al., 2020). A preferência ecológica é diversificada entre essas espécies, por exemplo, o fungo zoofílico *T. mentagrophytes* produz colônias pulverulentas, em contrapartida, o *T. interdigitale*, que produz micélio aéreo com numerosos conídios, é antropofílico (Kim et al., 2018).

Na prática clínica, é comum que os isolados antropofílicos obtidos do pé, de colônias aveludadas, sejam denominados *T. interdigitale*, já os isolados pulverulentos, independente da origem, são classificados como *T. mentagrophytes* (Symoens et al., 2011). Porém, essa estratégia de identificação da espécie é insuficiente, sendo recomendada a identificação molecular em combinação com a análise morfológica para diferenciar as espécies do complexo (Pacceu et al., 2013). Geralmente, dermatófitos caracterizados pela presença de colônias pulverulentas ou brancas como algodão, com pigmento amarelado no reverso, macroconídios multisseptados, microconídios piriformes agrupados em cachos e hifas espirais, são classificados como *T. mentagrophytes* na clínica (Rivas & Mühlhauser, 2015).

Em geral, o tratamento indicado para os casos de dermatomicoses causadas pelo complexo *T. mentagrophytes* é eficiente contra todos os membros do complexo, porém, vem sendo observado um aumento no número de infecções causadas por *T. interdigitale* resistente à terbinafina, o tratamento de escolha (Pires et al., 2014; Singh et al., 2018). Na Figura 2 podemos observar a micromorfologia da cultura de *T. mentagrophytes*.

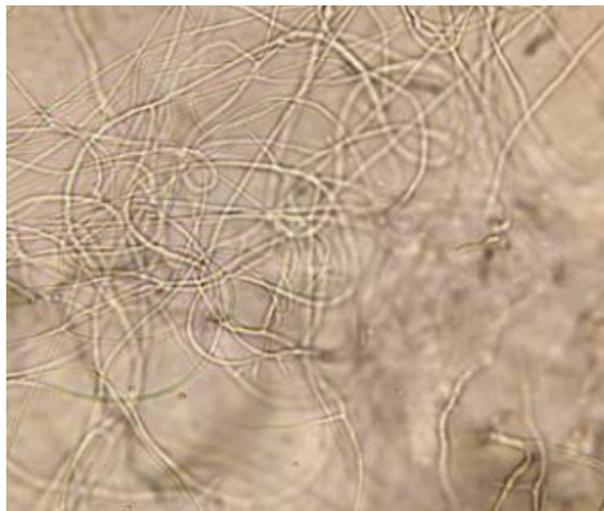


Figura 2: Micromorfologia da cultura de *T. mentagrophytes*.

Fonte: Fuentefria et al. (2019).

O processo infeccioso dos dermatófitos ocorre através da introdução de artrósporos ou conídios em lesões presentes na pele ou unhas, bem como em cicatrizes e queimaduras. O fungo invade a camada queratinizada (estrato córneo) e produz a exoenzima queratinase, induzindo uma reação inflamatória no sítio infeccioso (Lakshmipathy & Kannabiran, 2010). Outras enzimas também são secretadas durante o processo de invasão fúngica, que possibilitam a utilização de queratinas, outras proteínas, lipídios e DNA como fonte nutricional (Brasch, 2010; Gnat, Łagowski & Nowakiewicz, 2020).

Algumas pessoas são mais propensas a infecções por dermatófitos, sendo alguns dos fatores de risco: possuir animais de estimação, utilizar instalações desportivas públicas, uso de calçado oclusivo, possuir diabetes *mellitus*, doenças vasculares, além do envelhecimento da população (Havlickova, Czaika & Friedrich, 2009). O contato com animais é um fator importante que está envolvido com o aumento no número de infecções por dermatófitos, em especial pela alta incidência de animais de estimação presentes em casa, que muitas vezes são hospedeiros assintomáticos (Gnat, Łagowski & Nowakiewicz, 2020).

As condições clínicas de uma dermatofitose incluem coceira, dor, descamação, formação de vesículas e eritema, que variam de acordo com o sistema imunológico do hospedeiro, tipo ecológico e espécie patogênica, além da localização do processo infeccioso (Tainwala & Sharma, 2011). Esta micose

pode ser confundida com outras doenças dermatológicas como dermatite de contato, foliculite bacteriana, psoríase e eczema (Moriarty et al., 2012; Rashidian et al., 2015; Dogra & Narang, 2017).

O primeiro antifúngico utilizado no tratamento de dermatofitoses foi a griseofulvina, introduzida na década de 1950. O cetoconazol foi introduzido na década de 1980, e o fluconazol, terbinafina e itraconazol foram introduzidos anos depois (Sheehan et al., 1999). A partir da década de 1990, a terbinafina e o itraconazol foram as opções terapêuticas de escolha para o tratamento das dermatofitoses, exceto para *Tinea capitis*, que ainda apresenta como opção terapêutica efetiva a griseofulvina. Um fator importante que contribui para a eficácia do tratamento, é a afinidade do antifúngico pela queratina, que é observada no tratamento com cetoconazol, itraconazol e terbinafina, tornando esses fármacos as principais opções de escolha em relação a griseofulvina e fluconazol (Sardana et al., 2017; Khurana, Sardana & Chowdhary, 2019).

Novas opções terapêuticas foram introduzidas nos últimos anos, e a prospecção de novos antifúngicos é uma tendência crescente. O tratamento tópico é indicado para casos de *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea pedis* e *Tinea manuum*. Agentes tópicos pertencentes a classe dos azóis (clotrimazol, miconazol, econazol, oxiconazol) e a classe das alilaminas (terbinafina e naftifina) são muito utilizados (Gupta & Cooper, 2008). A terapia oral é empregada com frequência em casos de onicomicose e *Tinea capitis*, entretanto, em casos leves de onicomicose, há evidências de que o tratamento tópico com ciclopirox ou amorolfina apresenta eficácia terapêutica (Gupta & Cooper, 2008). É importante salientar que o tratamento tópico é indicado para combater infecções leves, presentes em pequenas áreas do corpo. Quando há um maior comprometimento da região do corpo infectada, ou quando a infecção é crônica ou recorrente, a terapia oral pode ser mais eficaz (Lopes, Tavará & Pintado, 2019). As equinocandinas apresentaram atividade *in vitro* contra os dermatófitos, porém, faltam estudos avaliando o uso clínico desses antifúngicos (Bao et al., 2013).

Os dermatófitos podem exibir tolerância ou resistência aos agentes antifúngicos disponíveis, independente do método de administração, causando falhas terapêuticas. Alguns mecanismos de resistência são observados nos

fungos dermatófitos, como as bombas de efluxo, enzimas de desintoxicação, além de modificações nos alvos dos fármacos (Cowen et al., 2014; Martinez-Rossi et al., 2018). As bombas de efluxo bombeiam os antifúngicos para fora das células fúngicas, reduzindo dessa forma suas concentrações intracelulares, resultando na perda de efetividade do fármaco (Putman et al., 2000; El-Awady et al., 2016).

Estudos relatam que a expressão aumentada de genes responsáveis pela desintoxicação celular nos dermatófitos, após exposição aos antifúngicos, são capazes de proteger esses fungos dos efeitos adversos dos fármacos (Persinoti et al., 2014). Essa capacidade aumentada em secretar exoenzimas pode estar relacionada com a patogenicidade dos dermatófitos e com suas respostas ao estresse celular e, conseqüentemente, aos mecanismos de desintoxicação (Brasch et al., 1991; Gnat et al., 2018; Gnat, Łagowski & Nowakiewicz, 2020).

É imprescindível que os agentes antifúngicos apresentem a capacidade de penetrar facilmente nas estruturas queratinizadas, permanecendo por tempo suficiente a fim de obter um efeito terapêutico. Caso contrário, exposições a concentrações subletais dos fármacos podem gerar tolerância ou resistência aos agentes antifúngicos em dermatófitos (Rajagopalan et al., 2018; Monod et al., 2019).

3.3. Onicomicose

A onicomicose é caracterizada por uma infecção fúngica que acomete as unhas, e é considerada a onicopatia mais frequentemente relatada (Brown, Turner & Wevrett, 2018). Fungos dermatófitos (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton* spp.), filamentosos (*Scopulariopsis* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.) e leveduriformes (*Candida* spp.) são os principais agentes causadores desta onicopatia (Westerberg & Voyack, 2013). A maioria das infecções ungueais causadas por dermatófitos (60-70%) são causadas por *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (Gupta et al., 2020).

Os dermatófitos continuam sendo os principais agentes causadores de onicomicose, entretanto, fungos não dermatofíticos estão sendo relatados com frequência, principalmente em regiões com clima quente (Raghavendra et

al., 2015; Rafat et al., 2019). A patogênese da onicomicose envolve o contato direto da unha com o fungo e, como a lâmina ungueal não possui imunidade mediada por células eficiente, a unha torna-se vulnerável às infecções fúngicas (Lipner & Scher, 2019). Alguns fungos são capazes de produzir enzimas com atividade proteolítica, lipolítica e queratinolítica, que auxiliam na invasão fúngica da unha e degradam a lâmina ungueal (Grover & Khurana, 2012).

Os sinais clínicos desta onicopatía são espessamento e descoloração da unha (amarela, branca, marrom), acúmulo de escamas subungueais, presença frequente de onicólise (separação da unha do leito ungueal) e comprometimento da pele adjacente em alguns casos (Lipner & Scher, 2015; Vlahovic, 2016). O dermatofitoma que se apresenta como uma faixa branca, amarela, marrom ou laranja na lâmina ungueal é característico de onicomicose (Lipner & Scher, 2019) e pode ser visualizado na Figura 3. O agravamento desses sintomas causados pela progressão da infecção faz com que a unha se desfaça, podendo afetar negativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas (Lipner & Scher, 2014). Fatores de risco como a presença de trauma na unha, psoríase, diabetes, circulação periférica comprometida, portadores do HIV e imunossupressão, aumentam a suscetibilidade ao desenvolvimento de onicomicose, sendo mais frequente no hálux, onde a unha cresce de forma mais lenta em relação às unhas das mãos (Gupta et al., 1997; Elewski, 1998; Lipner & Scher, 2015).



Figura 3: Dermatofitoma em paciente com onicomicose subungueal lateral distal. Fonte: Leung et al. (2020).

As unhas dos pés são as mais afetadas, especialmente o hálux e, geralmente, mais de uma unha é infectada e a *Tinea pedis* está presente frequentemente, como podemos observar na Figura 4.



Figura 4: Onicomicose associada à *Tinea pedis*.

Fonte: Leung et al. (2020).

A onicomicose pode ser dividida em cinco subtipos clínicos, que dependem do padrão de invasão do fungo. A onicomicose subungueal lateral distal é o subtipo mais comum, nesse caso, a invasão do fungo inicia pelo hiponíquio e progride para atingir o leito ungueal distal e a lâmina ungueal. É comum a presença de hiperqueratose e onicólise (Grover & Khurana, 2012; Piraccini & Alessandrini, 2015). A onicomicose superficial branca é caracterizada pela presença de pontos ou manchas brancas na superfície da unha (Grover & Khurana, 2012). Na onicomicose subungueal proximal, o fungo infecta a porção inferior da prega ungueal proximal e na sequência, o crescimento fúngico progride distalmente (Lipner & Scher, 2019). Outro subtipo de onicomicose conhecido como endonyx, é caracterizado por afetar somente a lâmina ungueal, sem comprometimento do leito ungueal e as unhas apresentam descoloração branca leitosa, sem evidências de hiperqueratose ou onicólise (Tosti et al., 1999). O último subtipo, a onicomicose distrófica total, é caracterizada pela destruição completa da lâmina ungueal. Esse subtipo é comumente relatado em um estágio final de onicomicose, onde a unha encontra-se severamente distrófica, fragmentada e espessa (Grover & Khurana, 2012; Piraccini & Alessandrini, 2015). Na Figura 5 podemos observar os cinco subtipos de onicomicose.



Figura 5: Subtipos de onicomicose. **A:** Onicomicose Lateral Distal Subungueal; **B:** Onicomicose Superficial Branca; **C:** Onicomicose subungueal proximal; **D:** Onicomicose Distrófica Total; **E:** Onicomicose Endonyx. Fonte: Tosti et al. (1999); Grover, Jakhar & Sharma (2020); Leung et al. (2020).

A combinação da microscopia com a cultura é considerada o padrão ouro para o diagnóstico micológico (Gupta et al., 2020). O exame direto utilizando KOH pode apresentar pouca sensibilidade, além de não determinar a viabilidade do fungo, em contrapartida, a cultura é a única técnica capaz de determinar o agente patogênico e sua viabilidade (Baran, 2019).

Dependendo da apresentação clínica na unha, diferentes formas de coletas devem ser realizadas. No caso de onicomicose subungueal distal e lateral, a amostra deve ser coletada na área mais proximal entre o leito ungueal e a lâmina ungueal. A onicomicose subungueal proximal requer o debridamento da lâmina ungueal, para alcançar os restos ungueais subjacentes. Já a onicomicose superficial de coloração branca requer a raspagem da porção dorsal da lâmina ungueal (Baran, 2019).

Algumas definições são utilizadas no que diz respeito a cura da onicomicose, pois existem diferenças entre a cura clínica e micológica. A cura é definida como clínica quando for possível observar a unha 100% clara, já a

cura micológica é definida quando a análise microscópica com KOH e a cultura da amostra apresentem resultados negativos. A cura completa é definida quando a unha apresente a coloração normal, 100% clara, em conjunto com a cura micológica (Gupta et al., 2020).

As opções terapêuticas para onicomicose incluem antifúngicos orais, tópicos e dispositivos como lasers. Os antifúngicos orais possuem altas taxas de sucesso, porém, estão associados a efeitos colaterais que podem comprometer o sistema hepático, cardíaco e renal. Além disso, podem interagir com outros fármacos e causar efeitos adversos graves. Nesse sentido, há uma tendência pela utilização da terapia tópica, pois o risco para o paciente é mínimo (Lipner, 2019). A Food and Drug Administration (FDA) aprovou a terapia utilizando lasers para eliminação temporária e/ou melhoria das unhas, mas ainda não foram definidas diretrizes para esse método terapêutico, e os resultados de eficácia apresentam a maior variação entre todas as opções de tratamento disponíveis (Ma et al., 2019).

Os antifúngicos orais prescritos com mais frequência para o tratamento da onicomicose são a terbinafina e o itraconazol, devido às suas altas taxas de cura, necessitando de uma administração que dura em torno de 12 semanas. A terbinafina apresenta eficiência na erradicação de dermatófitos, e de alguns fungos não dermatofíticos, entretanto, não é eficaz como os azóis no tratamento de onicomicose por *Candida* spp. O posaconazol pode ser uma alternativa em casos de resistência ao tratamento com terbinafina, itraconazol ou fluconazol (Gupta, Sauder & Shear, 1994; Ranawaka et al., 2016).

Os antifúngicos tópicos são desenvolvidos com o objetivo de penetrar na lâmina ungueal e atingir o leito ungueal, onde o fungo reside (Gupta et al., 2020). Ciclopirox, amorolfina, efinaconazol e tavaborol estão atualmente disponíveis para uso clínico, mas vale ressaltar que na América do Sul apenas o ciclopirox e a amorolfina encontram-se disponíveis (Gupta et al., 2019). O efinaconazol é um triazol efetivo contra fungos dermatofitos, não dermatofíticos e *Candida* spp., e tem como característica uma baixa afinidade pela queratina, garantindo uma maior disponibilidade do medicamento livre no sítio infeccioso (Gupta et al., 2020). A terapia com tavaborol foi aprovada recentemente (somente pelo FDA), sendo indicada para onicomicoses

ocasionadas por *T. rubrum* ou *T. mentagrophytes*. Um fator interessante nesse antifúngico é que o mesmo apresenta um novo mecanismo de ação, que envolve o bloqueio da síntese de proteínas fúngicas, pela inibição da leucil-tRNA sintetase (Sharma & Sharma, 2015).

Já o ciclopirox a 8% é um verniz para as unhas que demonstra efeitos promissores contra dermatófitos, alguns fungos não dermatofíticos e *Candida* spp. Seu mecanismo de ação envolve a inibição de enzimas dependentes de metais, pois apresenta em sua estrutura uma molécula que quela cátions trivalentes (Lee et al., 2005; Belenky, Camacho & Collins, 2015), comprometendo o transporte ativo da membrana celular fúngica, além da integridade dessa membrana, inibindo enzimas necessárias para a respiração celular (Gupta, Uro & Cooper, 2010). A amorolfina é eficaz contra dermatófitos, algumas leveduras e alguns fungos não dermatofíticos, pela inibição da enzima 14 Δ -redutase e 7 Δ -8 Δ -isomerase, interferindo nas vias de síntese de esteróis fúngicos (Gupta et al., 2020).

A eficácia do laser no tratamento da onicomicose é relatada de forma inconsistente, sendo que as taxas de cura pelo tratamento oral ou tópico são maiores do que o laser. O importante benefício do laser é melhora na aparência das unhas, tornando-as mais claras em pacientes com onicomicose. Não há evidências suficientes que confirmem que essa modalidade terapêutica seja capaz de erradicar completamente os fungos patogênicos (Gupta & Stec, 2019). Na revisão de Ma et al (2019), foi demonstrado que o tipo de laser influencia na eficácia terapêutica, com destaque para o laser de CO₂, que quando comparado ao laser Nd: YAG de 1064 nm, observa-se um aumento da temperatura com possível efeito esterilizante (Bhatta et al., 2014). Neste mesmo estudo, os autores relataram que o laser perfurado de CO₂ apresenta uma eficácia terapêutica superior no tratamento da onicomicose em relação ao laser fracionado de CO₂. O tratamento com laser é interessante para os pacientes que possuem intolerância aos antifúngicos, bem como para pessoas com doenças hepáticas, renais e gestantes (Ma et al., 2019).

É importante ressaltar que a terapia com laser, combinada com a administração de antifúngicos tópicos é mais eficaz no tratamento da onicomicose do que a terapia usando somente o laser (Zhou et al., 2016). O

laser pode proporcionar uma maior penetração dos fármacos na lâmina ungueal, no entanto, mais ensaios clínicos randomizados são necessários para avaliar de forma precisa a eficácia do laser (Ma et al., 2019). Como essa modalidade de tratamento é direcionada, o tecido circundante não é afetado, eliminando possíveis efeitos colaterais sistêmicos, sendo uma importante vantagem do laser (Gupta et al., 2018).

Outra modalidade terapêutica, conhecida como terapia fotodinâmica, envolve o uso de um fotossensibilizador de comprimentos de onda específicos, que forma espécies reativas de oxigênio, gerando citotoxicidade (Alberdi & Gómez, 2019). O fotossensibilizador é absorvido pelo fungo, que torna-se mais suscetível à apoptose ou necrose. Exemplos de fotossensibilizadores incluem: ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), metilaminolevulinato (MAL), porfirinas, cloreto de alumínio-ftalocianina, azul de metileno, azul de toluidina e rosa bengala (Bhatta et al., 2016; Morgado et al., 2017). Assim como o laser, os dados sobre a terapia fotodinâmica são escassos, sendo necessários estudos randomizados para confirmar a eficácia dessa terapia em pacientes com onicomicose (Leung et al., 2020). Com a intenção de aumentar a penetração de antifúngicos nas unhas, bem como para reduzir a carga fúngica, pode ser realizada a abrasão ou o corte das unhas. A extração da unha também é realizada em alguns casos, entretanto, é um procedimento doloroso e pode resultar em uma desconfiguração da lâmina ungueal (Angelo et al., 2017; Leung et al., 2020).

A intervenção farmacológica e a orientação transmitida pelo clínico aos pacientes são fatores imprescindíveis para evitar a recidiva da onicomicose. Em casos específicos, como pacientes diabéticos ou com um quadro grave de onicomicose, é importante haver uma profilaxia após a erradicação da infecção, pela aplicação de antifúngicos tópicos na planta dos pés e ao redor das unhas (Ko et al., 2011). Outra questão que deve ser levada em consideração é o descarte ou a desinfecção de calçados e meias, pois correspondem a fômites (Hammer, Mucha & Hoefler, 2011).

3.4. Mecanismo de ação dos antifúngicos e novos alvos terapêuticos

O arsenal de antifúngicos disponível para o tratamento de infecções

é limitado, pois grande parte dos compostos que possuem eficácia contra os fungos são tóxicos para as células de mamíferos, em função da similaridade entre as células eucarióticas (Hokken et al., 2019). Nas tabelas 1 e 2, estão resumidos os principais antifúngicos utilizados na clínica e seus respectivos alvos terapêuticos.

Tabela 1: Principais classes de antifúngicos e seus alvos celulares.

Classe	Fármaco	Alvo	Alvo molecular
Azóis	Fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, cetoconazol	Biossíntese de ergosterol	14 α -esterol desmetilase
Equinocandinas	Anidulafungina, caspofungina, micafungina	Biossíntese de 1,3 β -glicano	Subunidade catalítica do complexo 1,3 β -glicano sintase
Polienos	Anfotericina B, nistatina, natamicina	Biossíntese de ergosterol	Ergosterol em membranas fúngicas
Alilaminas	Terbinafina, naftifina	Biossíntese de ergosterol	Esqualeno epoxidase
Análogos de pirimidina	Flucitosina	Caminho de resgate de pirimidina	Moléculas de DNA / RNA
Benzofurano heterocíclico	Griseofulvina (dermatófitos)	Microtúbulos	Inibição da agregação de microtúbulos

Fonte: Hokken et al. (2019).

Tabela 2: Antifúngicos tópicos indicados para dermatofitoses.

Classe	Fármaco	Alvo	Alvo molecular
Azóis	Clotimazol, miconazol, econazol, luliconazol, lanocanazol, efinaconazol, cetoconazol, sertaconazol,	Biossíntese de ergosterol	14 α -esterol desmetilase

	oxiconazol, eberconazol, fenticonazol, bifonazol		
Alilaminas	Terbinafina, butenafina, naftifina	Biossíntese de ergosterol	Esqualeno epoxidase
Morfolina	Amorolfina	Biossíntese de ergosterol	14 Δ -reductase e 7 Δ -8 Δ -isomerase
Tiocarbamato	Tolnaftato	Biossíntese de ergosterol	Esqualeno epoxidase
Hidroxi piridona	Ciclopirox	Quelação de cátions metálicos trivalentes	Inibição de catalase e peroxidase. Transporte de elétrons mitocondrial e produção de energia
Oxaborol	Tavaborol	Inibição de síntese de proteínas	aminoacil-tRNA sintetases

Fonte: Khurana, Sardana & Chowdhary (2019).

De acordo com as tabelas 1 e 2, observa-se que a maioria dos antifúngicos atualmente disponíveis possuem alvos restritos à membrana plasmática e à parede celular, entretanto, novos alvos vêm sendo estudados para o desenvolvimento de novas terapias. Relembrando, o ergosterol é um lípidio envolvido com a permeabilidade e fluidez da membrana plasmática, bem como com a funcionalidade das proteínas integrais da membrana fúngica. O ergosterol é o alvo de diversos antifúngicos, seja pela inibição da síntese de ergosterol ou ligando-se a ele (Scorzoni et al., 2017). Como visto anteriormente, os azóis inibem a enzima 14- α desmetilase, que é essencial na biossíntese do ergosterol, pela conversão de lanosterol em ergosterol. Essa inibição resulta na perda de integridade da membrana celular fúngica e inibição do crescimento (Kathiravan et al., 2012).

A classe alilamina também inibe a biossíntese do ergosterol, porém,

pela inibição da enzima esqualeno epoxidase, resultando no acúmulo de esqualeno e na ausência de outros derivados de esterol (Kathiravan et al., 2012). Essa classe de antifúngicos é muito eficiente no tratamento de infecções por dermatófitos, pelo maior acúmulo na pele e no leito ungueal em comparação com o sangue, e isso pode ser explicado pela característica lipofílica das alilaminas (Ngo et al., 2016).

Os polienos como a nistatina e anfotericina B, ao se ligarem ao ergosterol, formam um complexo capaz de romper a membrana, gerando o extravazamento de íons e de outros conteúdos citoplasmáticos (Odds, Brown & Gow, 2003). Outro mecanismo de ação dos polienos é a cascata de reações de oxidação bem como de interações com as lipoproteínas, que desestabilizam a membrana através da liberação de radicais livres (Mesa-Arango et al., 2014).

Em relação à parede celular, é importante lembrar que a mesma é constituída principalmente por quitina, glicanas, mananas e glicoproteínas, atuando como uma barreira protetora para os fungos, pois dificulta a entrada de fármacos que possuem como alvo a membrana celular. Além disso, a parede celular possui um papel fundamental para adesão e patogênese dos fungos (Bowman & Free, 2006). A inibição da quitina e a inibição da síntese de β -glicanas são os principais mecanismos de ação dos antifúngicos direcionados à parede celular (Kathiravan et al., 2012).

As equinocandinas possuem mecanismo de ação específico com alvo na parede celular, pelo bloqueio da enzima glicano sintase que, conseqüentemente, inibe a síntese de β -1,3 glicanos (Odds, Brown & Gow, 2003). Esse bloqueio reduz a incorporação de monômeros de glicose ligando β -1,3 e β -1,6 glicanos, gerando a lise celular pelo enfraquecimento da parede celular (Kathiravan et al., 2012). A toxicidade das equinocandinas é mínima, uma vez que seus alvos não estão presentes nas células de mamíferos (Patil & Majumdar, 2017). As polioxinas são uma classe de moléculas que têm como alvo a quitina sintase, que está envolvida com o alongamento da cadeia de quitina, sendo considerado um alvo atraente (Kathiravan et al., 2012). A quitina encontra-se em pequenas quantidades nas leveduras (1-2%), mas em quantidade considerável nos fungos filamentosos (10-20%) (Bowman & Free, 2006).

Outro mecanismo de ação conhecido de alguns antifúngicos é a inibição da síntese de ácidos nucleicos e microtúbulos. A 5-flucitosina atua inibindo a síntese de ácido nucleico, através da conversão desse antifúngico em 5-fluorouracil pela enzima citosina desaminase que na sequência, é convertida em ácido 5-fluorouridílico. Esse ácido inibe a enzima timidilato sintetase, interferindo na síntese de DNA e incorpora-se ao RNA, prejudicando a síntese proteica (Odds, Brown & Gow, 2003). Já a griseofulvina inibe a funcionalidade dos microtúbulos, inibindo a mitose na célula fúngica, pela ruptura do arranjo do fuso mitótico (Kathiravan et al., 2012).

O estresse oxidativo também pode danificar as células fúngicas, como pelo tratamento com anfotericina B. Esse antifúngico pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*, aumentando o efeito fungicida do fármaco (Ferreira et al., 2013; Mesa-Arango et al., 2014).

Novos alvos terapêuticos englobam a inibição da proteína Hsp90 e a inibição da sinalização de calcineurina (Figura 6). A proteína Hsp90 contribui para a sobrevivência dos microrganismos e é sintetizada como uma resposta adaptativa às condições nocivas, tornando-se um alvo atrativo para a terapia antifúngica (Jacob et al., 2015). A calcineurina é uma proteína envolvida com a regulação de processos celulares fundamentais em algumas leveduras e fungos filamentosos, como no crescimento, transição morfológica, homeostase, resposta ao estresse, resistência, mas especialmente na integridade da parede celular, pois influencia na biossíntese de ergosterol, de quitina e de β -glicanos (Blankenship et al., 2003; Steinbach et al., 2006; Scorzoni et al., 2017). Os trifeniletlenos descritos por Butts et al. (2014) foram sugeridos como uma nova classe de antifúngicos que atuam inibindo o ativador da calcineurina em *Cryptococcus neoformans*, agindo na homeostase do cálcio (Odom, 2014).

Na Figura 6 foram resumidos os alvos dos antifúngicos, bem como os novos alvos que são candidatos a ação dos antifúngicos.

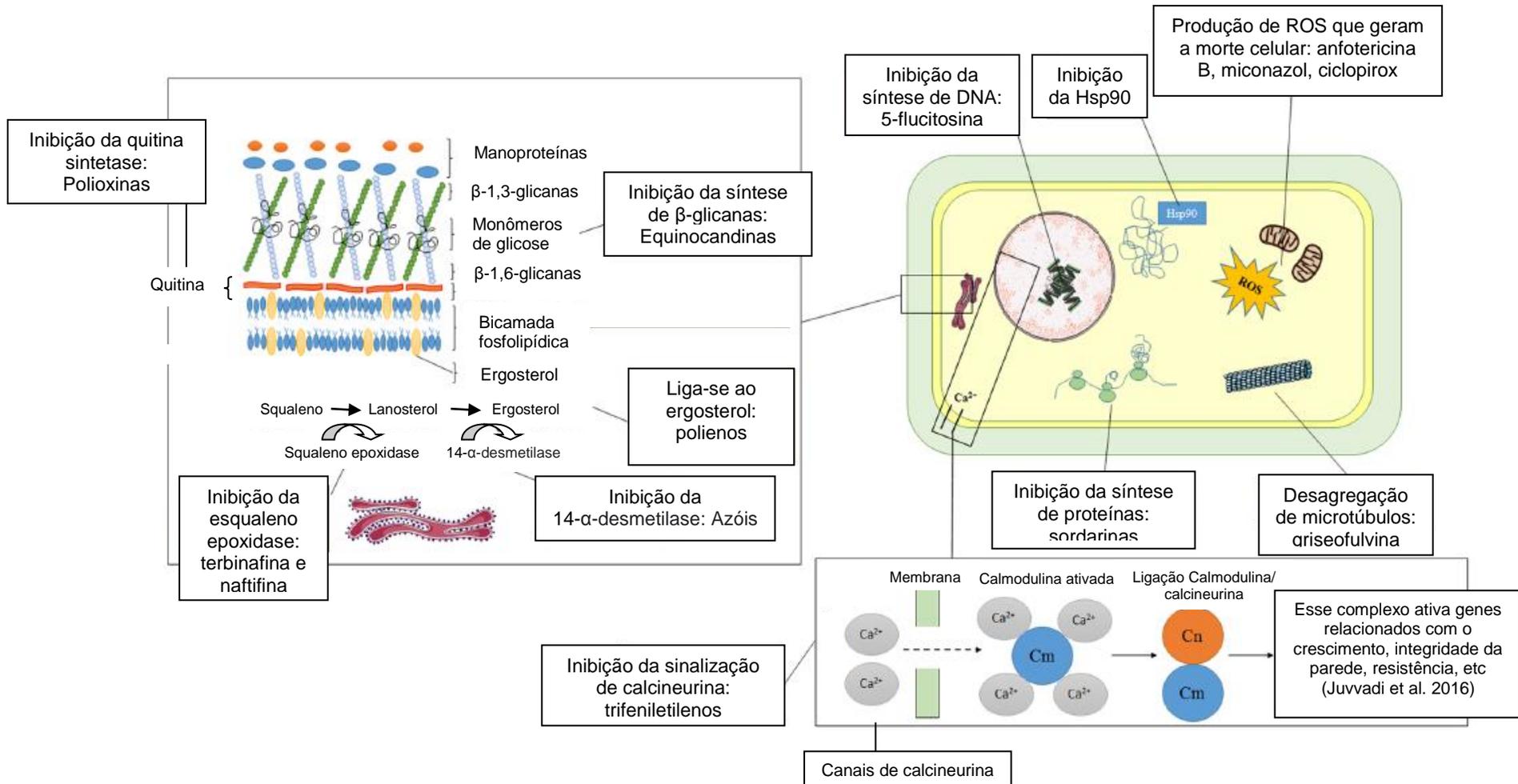


Figura 6: Alvos antigos e novos como candidatos a ação dos antifúngicos.
 Fonte: Scorzoni et al. (2017).

3.5. Mecanismos de resistência aos antifúngicos

O uso generalizado de antifúngicos aliado a um arsenal limitado vêm revelando um perfil de resistência em fungos clinicamente importantes, como *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*. Alguns mecanismos adquiridos de resistência aos antifúngicos foram identificados, como alteração ou superexpressão de alvos terapêuticos, regulação positiva de transportadores de fármacos e ativação de resposta ao estresse (Shapiro, Robbins & Cowen, 2011). De acordo com Revie et al. (2018), mecanismos diferentes governam a resistência adquirida e intrínseca. O desenvolvimento de resistência adquirida pode ocorrer em função da superexpressão de alvos terapêuticos, substituições de aminoácidos no alvo terapêutico, impedindo a ligação dos fármacos, sinalização através de vias de resposta ao estresse, regulação positiva de bombas de efluxo ou alterações nas vias celulares. Essa resistência adquirida pode ser acelerada em função da plasticidade genética do microrganismo, da existência de cepas hipermutadas ou por pressões ambientais, pelo uso indiscriminado de fungicidas agrícolas, que geram resistência cruzada em isolados clínicos (Revie et al., 2018).

Em contrapartida, a resistência primária ou intrínseca ocorre através de mecanismos que se sobrepõem aos implicados na resistência adquirida, como a incompatibilidade de alvo terapêutico, sinalização de resposta ao estresse e a superexpressão da bomba de efluxo. Também é importante destacar que a formação de biofilmes diminui a suscetibilidade aos antifúngicos, já que a estrutura do biofilme dificulta que o fármaco atinja seu alvo. A combinação entre os mecanismos de resistência adquiridos e intrínsecos seleciona microrganismos cada vez mais resistentes (Revie et al., 2018).

Os antifúngicos azóis ligam-se ao átomo de ferro encontrado no grupo heme da enzima 14- α -lanosterol desmetilase, essa ligação bloqueia a desmetilação da enzima, interrompendo a produção de ergosterol e resultando no acúmulo de esteróis tóxicos que desestabilizam a membrana e impede o crescimento dos fungos (Robbins, Wright & Cowen, 2016). A 14- α -lanosterol demetilase é codificada pela proteína Erg11 em leveduras e Cyp51A/Cyp51B em bolores. A resistência aos azóis envolve especialmente alterações ou

superexpressão de genes que são alvos terapêuticos (*ERG11/ cyp51A/ cyp51B*). Geralmente isolados do gênero *Candida* e *Aspergillus* resistentes aos azóis apresentam substituições de aminoácidos próximos ao local de ligação do antifúngico (Marichal et al., 1999; Balashov et al., 2005).

A superexpressão de *ERG11* é comumente evidenciada em isolados de *C. albicans* resistentes aos azóis. Essa superexpressão está diretamente relacionada com a resistência, já que o alvo em abundância necessita de maior quantidade de antifúngico para uma completa inibição (Franz et al., 1998), reduzindo dessa forma a suscetibilidade (Akins, 2005). Vários mecanismos são responsáveis pela superexpressão de *ERG11* em isolados resistentes aos azóis, um exemplo é a formação de um isocromossomo contendo duas cópias do braço esquerdo do cromossomo 5, no qual encontra-se o *ERG11*, ou pela duplicação de todo o cromossomo (Selmecki et al., 2006).

A superexpressão de *Cyp51A* em *A. fumigatus* foi observada em isolados clínicos de um paciente que apresentou falha terapêutica utilizando azol. Após realizar o sequenciamento do genoma desses isolados, verificou-se uma mutação na subunidade do complexo do fator de transcrição de ligação CCAAT HapE, que gerou uma substituição de aminoácido P88L, aumentando a expressão de *cyp51A* (Arendrup et al., 2010; Camps et al., 2012).

A ativação de bombas de efluxo associadas à membrana fúngica é outro mecanismo de resistência encontrado em muitas espécies fúngicas. É importante ressaltar que esse mecanismo não é encontrado em fungos resistentes à classe das equinocandinas ou polienos, pois o alvo desses antifúngicos encontra-se no exterior da célula fúngica (Cannon et al., 2009).

Em relação à resistência aos azóis, dois sistemas de efluxo estão envolvidos, a superfamília de transportadores de ligação de ATP (ABC) e a superfamília de facilitador principal (MFS) (Cowen et al., 2014). Os transportadores Cdr1 e Cdr2 do cassete de ligação de ATP (ABC), bem como o principal facilitador Mdr1, foram todos implicados na resistência clínica aos azóis em muitas espécies de *Candida*. Além disso, a regulação positiva de Mdr1 demonstrou facilitar a evasão de *C. albicans* do sistema imunológico do hospedeiro, por meio do efluxo de histatina, um peptídeo antimicrobiano (Hampe et al., 2017). A regulação positiva de *CDR1* e *CDR2* está envolvida

com a resistência aos azóis através do efluxo do antifúngico, que reduz o acúmulo do mesmo na célula fúngica (Sanglard et al., 2009).

Diversos fatores ABC foram identificados em outros isolados resistentes aos azóis, como o CgCdr1, CgCdr2 e CgSnq2 em *C. glabrata*, Afr1 em *C. neoformans* e AtrF em *A. fumigatus* (Slaven et al., 2002; Coleman & Mylonakis, 2009). A expressão dos transportadores de membrana CgFLR1 e CgFLR2 em *C. glabrata* resultaram em um fenótipo resistente à 5-flucitosina, pelo efluxo do antifúngico (Pais et al., 2016).

Diversos estudos demonstram o papel das mitocôndrias no desenvolvimento de resistência aos antifúngicos. A perda de função mitocondrial em *C. glabrata* proporcionou o aumento na resistência ao fluconazol (Sanglard et al., 2001). Em isolados de *A. fumigatus*, mutações no complexo mitocondrial I, revelaram que esses isolados eram resistentes aos azóis (Bromley et al., 2016).

Um perfil resistente a classe das equinocandinas é resultado de mutações em regiões denominadas “hot spots”, onde foi possível verificar substituição de aminoácidos no gene *FKS1* (encontrado em todas as espécies de *Candida*) ou em regiões homólogas de *FKS2* (específico de *C. glabrata*) (Park et al., 2005; Garcia-Effron et al., 2009). Essas substituições de aminoácidos reduzem a sensibilidade da enzima glicano sintase às equinocandinas, elevando os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 50 a 100 vezes (Cowen et al., 2015). Em *C. glabrata* é possível reverter a resistência mediada pela mutação em *FKS2*, pela administração de inibidores de calcineurina, pois a expressão de *FKS2* é dependente de calcineurina (Katiyar et al., 2012).

Outro mecanismo importante que implica na resistência às equinocandinas é o aumento da síntese de quitina, que reduz a eficácia dos antifúngicos. A expressão do gene reponsável pela síntese de quitina é induzida pela exposição de diversas espécies de *Candida* a baixos níveis de equinocandinas (Walker et al., 2008; Walker et al., 2013). Além disso, a proteína Hsp90, sintetizada em resposta à condições de estresse, contribui para a sobrevivência de microrganismos patogênicos, gerando um impacto na resistência tanto aos azóis como às equinocandinas (Cowen et al., 2015; Jacob

et al., 2015). Inibidores de Hsp90 em *A. fumigatus* e *A. terreus* proporcionaram um aumento na suscetibilidade à caspofungina e, em *C. albicans*, essa inibição aumentou a suscetibilidade aos azóis (Cowen, 2009).

Em isolados resistentes à terbinafina, verificou-se a presença de substituições de aminoácidos na esqualeno epoxidase, que é o alvo desse antifúngico. Em *A. fumigatus*, por exemplo, foi evidenciada a substituição F389L no gene *ergA*, responsável pelo perfil resistente à terbinafina (Rocha et al., 2006). Terbinafina, que é comumente utilizada no tratamento de infecções por fungos dermatófitos, já apresentou relatos de resistência em *T. interdigitale*, pela substituição de aminoácidos no gene da esqualeno epoxidase *erg1* (Singh et al., 2018).

A 5-flucitosina é conhecida por induzir rápida resistência, nesse sentido, é utilizada em terapia combinada (Vermes et al., 2000). A resistência a esse antifúngico ocorre, geralmente, por uma mutação na permease FCy2, que impossibilita a entrada da 5FC na célula fúngica. Outra possibilidade é a presença de mutações nas enzimas Fur1 ou Fcy, que inibe a conversão da 5FC em 5-fluorouracil (Hokken et al., 2019). Na Figura 7 podemos observar um resumo sobre os mecanismos de resistência aos antifúngicos mencionados.

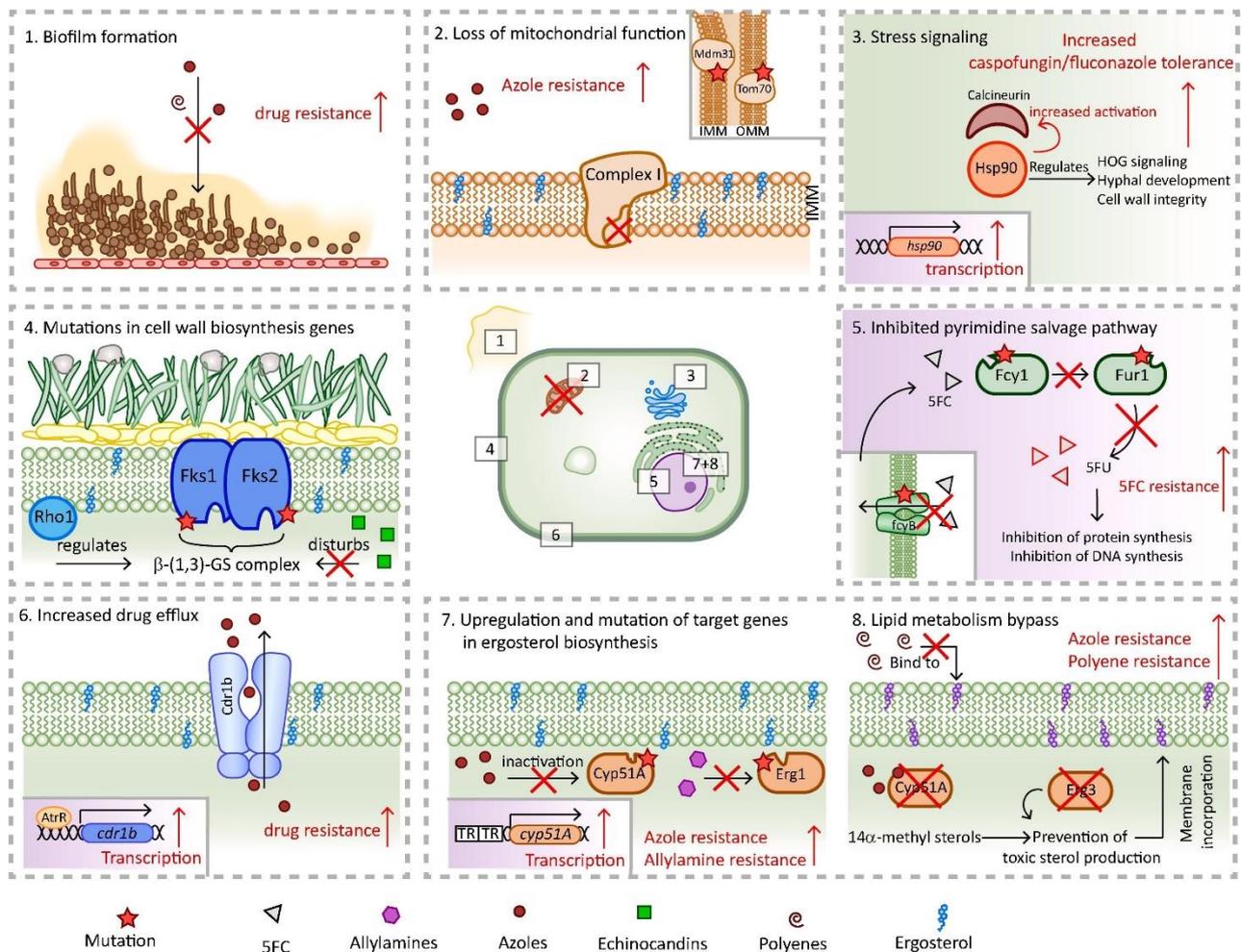


Figura 7: Mecanismos de resistência aos antifúngicos encontrados em fungos.

1: A estrutura do biofilme reduz a penetração do antifúngico, comprometendo sua eficácia. **2:** Mutações que resultam na perda do complexo mitocondrial I, que induz resistência aos azóis. **3:** A ativação de Hsp90 em situações de estresse geram tolerância aos azóis e equinocandinas. **4:** Mutações em subunidades catalíticas do complexo 1,3 β -glucano sintase interferem na eficácia das equinocandinas. **5:** Mutações em FcyB evitam a entrada de flucitosina na célula. Mutações em Fcy1 interrompem a conversão da flucitosina em 5-fluorouracila, que é tóxica. **6:** A atividade aumentada de transportadores de efluxo de fármacos resulta em menor concentração de antifúngicos no interior da célula. **7:** Mutações em esqualeno epoxidase erg1 interrompem a atividade de alilaminas e, mutações na 14 α -esterol desmetilase Cyp51A interrompem a atividade dos azóis. **8:** Alterações em Erg3 interrompe a produção de esteróis tóxicos se Cyp51A for inibido por compostos azólicos.

Fonte: Hokken et al. (2019).

3.6. Modelos alternativos de infecções fúngicas

Uma etapa importante durante o desenvolvimento de um projeto de pesquisa é a escolha de um método experimental adequado. Os modelos *in vivo* são amplamente empregados na pesquisa e envolvem um número elevado de animais para obtenção de resultados representativos, sendo necessária a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa. Os modelos *in vitro* também são muito empregados, e englobam o cultivo de células que serão utilizadas de forma isolada. Já os modelos *ex vivo* envolvem o uso de fragmentos de tecidos, como pele, córnea, cascos, onde a estrutura do tecido é preservada, sendo uma alternativa aos modelos murinos. Estes modelos estão atrelados aos princípios de Russell e Burch, conhecidos por Princípio dos 3 R's, que se referem à redução, à substituição e ao refinamento do uso de animais em laboratório (Clark, 2018).

Modelos *ex vivo* de infecções fúngicas são desenvolvidos em um microambiente fisiológico 3D, onde é possível preservar características fundamentais dos tecidos. Nos explantes de pele, por exemplo, os folículos capilares são mantidos, sendo uma vantagem em relação aos métodos de cultura celular *in vitro* ou 2D (Baumbach et al., 2020). Explantes de pele oriundos de cirurgias redutivas vêm sendo utilizados para avaliar o reparo da barreira da pele (Danso et al., 2015), bem como a cicatrização de feridas (Xu et al., 2012) e doenças inflamatórias (Guilloteau et al., 2010). Alguns modelos *ex vivo* de infecções fúngicas foram propostos para estabelecer um quadro infeccioso na unha e na pele, utilizando lascas de unha humana e fragmento de pele oriundos de abdominoplastia (Peres et al., 2016).

Peres et al. (2016) padronizaram um modelo *ex vivo* de infecção fúngica em folhas de estrato córneo e compararam os resultados com a cultura de células. Os autores observaram que no modelo *ex vivo*, o *T. rubrum* foi capaz de expressar alguns genes, auxiliando no entendimento dos aspectos moleculares envolvidos com a interação entre o patógeno e o hospedeiro durante o processo infeccioso. Poyntner et al. (2016) estabeleceram pela primeira vez uma infecção traumática por *Exophiala dermatitidis* em um modelo *ex vivo* de pele humana. Os recortes de pele foram feridos e inoculados com o fungo e incubados a 37°C para simular a temperatura corporal, durante uma

semana. A adesão fúngica foi confirmada microscopicamente e foi realizado o sequenciamento do RNA através da biomassa colhida, para auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares que este fungo utiliza para infectar a pele.

A mucosa vaginal suína (Pereira et al., 2017), a córnea humana e de coelho (Pinnock et al., 2017) e o túbulo dentário (Chandra et al., 2010) são outros exemplos de modelos alternativos aos métodos *in vivo*. Esses modelos são protótipos interessantes para analisar o potencial antifúngico de novos fármacos durante a fase pré-clínica. Em relação aos modelos *ex vivo* de onicomicose, a utilização de cascos de animais é uma escolha atraente, já que é possível mimetizar a barreira natural que é a unha, sendo um desafio para a penetração dos agentes antifúngicos (Elewski et al., 2013). Além disso, há uma fonte de queratina presente, que é o principal constituinte da unha humana, alvo dos dermatófitos, e que é capaz de ligar-se e inativar alguns antifúngicos (Osborne et al., 2004; Schaller et al., 2009).

Na revisão de Quatrin et al. (2019), foram reunidos diversos artigos contendo modelos alternativos aos métodos *in vivo*. Observamos que vários substitutos para a unha humana foram propostos em ensaios *ex vivo*, como o casco suíno e o bovino, unhas de cadáveres, unhas pulverizadas e filmes de queratina. Em relação às infecções cutâneas, além de fragmentos de pele humana, modelos com pele de porco e gato também foram utilizados. Em infecções na mucosa oral, a mucosa de camundongos, coelhos e porcos são protótipos interessantes para induzir um quadro de candidíase oral (Ohnemus et al., 2007; Shin et al., 2013; Labib & Aldawsar, 2015).

3.7. Compostos organoselênio

O selênio (Se) é um elemento calcogênio essencial para o organismo, ingerido através da alimentação, é responsável por preservar a integridade dos ossos e articulações. Sua deficiência pode causar uma doença chamada Keshan, que causa alterações no músculo cardíaco (Fairweather-Tait et al., 2011). Esse elemento tem um efeito ambivalente no organismo, pois pode ser altamente tóxico se for ingerido em excesso. Dependendo da forma química do Se, a toxicidade e a biodisponibilidade são afetadas. Os compostos

de Se inorgânico normalmente são mais tóxicos do que os compostos de Se orgânico (Kobayashi, Suzuki & Ogra, 2018). Em relação ao composto orgânico selenocianato (SeCN^-), foi relatado que em células de mamíferos ele é um metabólito do Se (Anan et al., 2015). O Se pode apresentar-se em quatro estados de oxidação, que inclui o seleneto, Se elementar, selenito e selenato (Chasteen & Bentley, 2003), como pode ser observado na Figura 8.

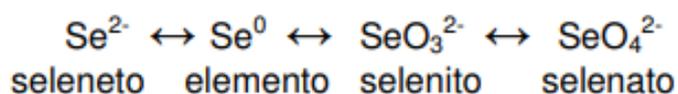


Figura 8: Estados de oxidação do selênio.

Fonte: Chasteen & Bentley (2003).

A síntese de uma nova classe de moléculas com diferentes propriedades farmacológicas é um caminho atrativo na busca por novas opções terapêuticas. É de conhecimento científico que os compostos organoselênio possuem potente atividade antibacteriana e antifúngica (Mugesh, du Mont & Sies, 2001). Algumas publicações demonstram propriedades interessantes de compostos organoselênio, como no estudo de Chao e colaboradores (2019), onde foi descrita a atividade de derivados de selenocianatos contra o *Trypanosoma cruzi*. Também foram classificados como agentes leishmanicidas (Etxebeste-Mitxelorena et al., 2020). O potencial anticancerígeno de compostos organoselênio também foi demonstrado em vários estudos (Poerschke & Moos, 2011; Chen et al., 2009; Nie et al., 2020).

A síntese de novos selenocianatos e disselenetos abordada no estudo de Baquedano et al. (2016), revelou uma potente atividade contra a forma amastigota de *Leishmania infantum*. Alguns compostos foram selecionados para estudos futuros, por apresentarem uma importante atividade antiparasitária e baixa toxicidade para células humanas, sendo candidatos interessantes para o desenvolvimento de um novo medicamento antiparasitário. Thana et al. (2018) sintetizaram uma série de ebselen contendo os substituintes C-Se-N, e avaliaram sua atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, revelando resultados promissores com CIM variando de 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Foi demonstrado que o ebselen possui potente atividade antifúngica contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp, em concentrações variando entre 0,5 a 2 µg/mL. Em relação ao seu mecanismo de ação, o mesmo não foi completamente compreendido, mas evidências indicam que o ebselen gera um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), pelo esgotamento de glutathiona intracelular (GSH), perturbando a homeostase das células fúngicas (Thangamani et al., 2017). Em bactérias multirresistentes, incluindo o *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp., o ebselen também apresentou ação antimicrobiana (Wojtowicz et al., 2004; Thangamani, Younis & Seleem, 2015). Em *Fusarium* spp., os compostos organoselênio disseleneto de difenila e ebselen revelaram potente atividade antifúngica, de forma isolada e em combinação com antifúngicos comerciais (Venturini et al., 2016). Novos derivados de organoselênio (imidazo [1,2- a] piridina) foram sintetizados no estudo de Kumar e colaboradores (2017), revelando uma potente ação antimicrobiana, observada pelos efeitos sinérgicos eficazes em combinação com antibióticos. O perfil de toxicidade dos derivados em relação às células HEK-293 e HeLa encontram-se dentro da faixa aceitável (Kumar et al., 2017).

O Selenazol é outro exemplo de composto organoselênio que possui promissoras propriedades antimicrobianas, contra *Candida* spp. bem como frente às bactérias *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Al-Rubaie et al., 2014; Łączkowski et al., 2016). O disseleneto de difenila (PhSe)₂ e seus análogos sintéticos, demonstraram uma atividade de amplo espectro contra *C. albicans* (CIM: 4-32 µg/mL), *C. dubliniensis* (CIM: 2-16 µg/mL), *Aspergillus* spp. (0,5-64 µg/mL) e *Fusarium* spp. (2-16 µg/mL) (Loreto et al., 2011).

3.8. Derivados indólicos

Os indóis são moléculas constituídas por um grupamento de anéis heterocíclicos, amplamente explorados em química medicinal. Possuem diversas propriedades farmacológicas, como ação anticancerígena (Jia et al., 2020), antiviral (Zhang, Chen & Yang, 2015; Wang et al., 2019), antibacteriana (Ciulla & Kumar, 2018; Liu et al., 2020), anti-inflamatória e antidepressiva (Chadha & Silakari, 2017). Além disso, apresentaram efetividade no combate

aos sintomas da enxaqueca, vômitos e hipertensão (Chadha & Silakari, 2017). O indol foi identificado nos anos de 1860 por Baeyer e seus colegas de trabalho e, desde então, ganhou expressiva popularidade, por apresentar uma arquitetura molecular atrativa para a projeção de derivados indólicos de interesse medicinal (Baeyer, 1866; Chadha & Silakari, 2017). A estrutura química do indol engloba a fusão do benzeno com o anel pirrol (Baeyer, 1869).

Diversas espécies de plantas possuem o indol como um fitoconstituente e, além disso, algumas bactérias são capazes de produzir o indol naturalmente. O aminoácido triptofano possui o indol em sua estrutura química (Hopkins & Cole, 1901). Exemplos de alcaloides indólicos naturais aprovados pelo FDA englobam a vincristina, vinblastina, vinorelbina e vindesina, utilizados para o tratamento do câncer, a ajmalina, que possui atividade antiarrítmica, bem como o parassimpaticomimético fisostigmina, utilizado para o tratamento do glaucoma e doença de Alzheimer (Chadha & Silakari, 2017). Estes compostos naturais inspiraram a síntese de compostos indólicos sintéticos. Exemplos sintéticos incluem a indometacina (anti-inflamatório), ondansetrona (antieméticos), fluvastatina (hipercolesterolemia) e zafirlucaste (antagonista do receptor de leucotrieno) (Chadha & Silakari, 2017).

Uma ampla gama de compostos indólicos de origem natural com atividade antimicrobiana merece destaque, como os originários da *Alstonia scholaris*, utilizado para o tratamento da malária, icterícia, problemas gastrointestinais, câncer, entre outros (Chadha & Silakari, 2017). *Aspidosperma* sp. é outro gênero botânico de onde pode ser extraído o alcaloide indólico aspidospermidine, conhecido por apresentar propriedades antiparasitárias contra *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma* (Coatti et al., 2015). O antibiótico indolicina, originário do briozoário *Amathia convolute*, é eficaz contra *S. aureus* e *Helicobacter pylori*, sendo outro exemplo de derivado indólico (Kanamaru et al., 2001; Hurdle, O'Neill & Chopra, 2004). Um alcaloide extraído de outro briozoário marinho, conhecido como *Flustra foliacea*, apresenta atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (Wright, 1984).

Derivados indólicos sintéticos com atividade antimicrobiana foram projetados em diversos estudos. A dimerização ou hibridização de indóis, por exemplo, consiste de técnicas que foram abordadas na revisão de Meng et al.

(2020), para obtenção de novas moléculas com propriedades antibacterianas contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Essas técnicas revelam um avanço importante da ciência, já que a escassez de novos antimicrobianos é uma realidade na atualidade. A síntese de novos análogos do fluconazol, com substituição de uma molécula de triazol por uma molécula de indol foi abordada no estudo de Lebouvier et al. (2020), onde foi observada uma potente atividade antifúngica contra *Candida* spp. Singh e colaboradores (2011) também sintetizaram derivados indólicos, que apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Compostos indólicos sintéticos também apresentaram efetividade contra *Aspergillus niger* (Sakhuja et al., 2011). Nesse mesmo estudo, os autores verificaram uma atividade antibacteriana de amplo espectro, contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Klebsiella pneumoniae*, bem como para a levedura *Candida albicans* (Sakhuja et al., 2011).

A síntese de agentes antimicrobianos derivados do indol, caracterizada pela substituição eletrofílica da terceira posição, bem como do NH do núcleo do indol, é frequentemente realizada pelos químicos medicinais. Além disso, a cicloadição na segunda e terceira posição revelou potentes atividades antimicrobianas. Em contrapartida, estudos indicam que substituir a terceira posição do indol por pequenos grupos, como o metil, resulta em compostos com ação antimicrobiana moderada. Na Figura 9 é possível observar as substituições que são indicadas para a síntese de derivados indólicos com atividade antimicrobiana (Chadha & Silakari, 2017).

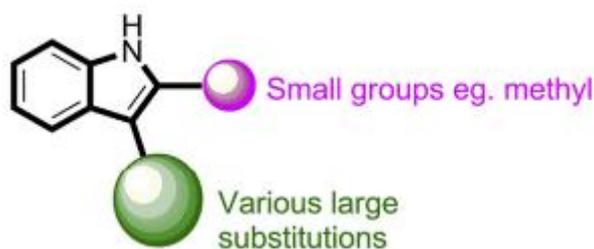


Figura 9: Requisitos estruturais para obtenção de agentes antimicrobianos derivados do indol. Fonte: Chadha & Silakari (2017).

Relatos indicam que os indóis são capazes de inibir a proteína quinase (Kiliç, Işğör & Olgen, 2009; Ölgen, 2011) e, além disso, evidenciou-se

que o indol é metabolizado pelo citocromo P450 2A6 humano (Gillam et al., 2000). Essas características apoiam a utilização de indóis como um arcabouço farmacêutico para o desenvolvimento de novos fármacos (Suenkel, Fischer & Steegborn, 2013). As diversas propriedades biológicas dos derivados indólicos demonstram o quão promissor é a presença desse composto orgânico na síntese de novas moléculas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de realização da pesquisa

Os experimentos descritos neste estudo foram realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e Instituto Federal Catarinense (IFC-Campus Concórdia). Os experimentos microbiológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (Faculdade de Farmácia/UFRGS), a síntese das moléculas foi realizada no Laboratório de Química Medicinal de Compostos de Selênio (QMCSel/UFCSPA) e os ensaios toxicológicos foram realizados em parceria com a UNIPAMPA e IFC-Campus Concórdia.

4.2. Seleção dos fungos de interesse

No total, 40 isolados clínicos e ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) foram utilizados neste estudo: *C. tropicalis* (ATCC 750, 17P, 72P, RL104 e ATCC 950), *C. krusei* (CK01, CK02, CK03, RL102 e DEN43), *C. parapsilosis* (RL11, RL13, RL33, RL100 e CP007), *C. glabrata* (RL03, RL22, RL37, RL105 e CG09), *C. albicans* (CA01, CA02, DEB05, DEB09 e ATCC 18804), *N. gypsea* (MGY 01, MGY 1, MGY 2, MGY 3 e MGY 50), *T. mentagrophytes* (TME 1, TME 2, TME 3, TME 40, e TME 46), e *T. rubrum* (TRU 2, TRU 3, TRU 45, TRU 47 e TRU 51), pertencentes à micoteca do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil).

4.3. Obtenção dos 3-Selenocianatos-indólicos 4a-g

Neste estudo foram avaliados sete compostos derivados do selenocianato-indólico (**4a-g**): (**4a**) 3-selenocianato-1*H*-indol; (**4b**) 5-bromo-3-

selenocianato -1*H*-indol; **(4c)** 5-iodo-3-selenocianato-1*H*-indol; **(4d)** metil 3-selenocianato-1*H*-indol-5-carboxilato; **(4e)** 3-selenocianato-1*H*-indol-4-carbonitrila; **(4f)** 2-fenil-3-selenocianato-1*H*-indol e **(4g)** 1-metil-2-fenil-3-selenocianato-1*H*-indol.

O processo geral de síntese dos compostos foi realizado pela combinação de malononitrila (3 mmol) e SeO₂ (6 mmol), que foram agitados em DMSO (5 mL) à temperatura ambiente por 15 minutos em um frasco de fundo redondo. Em seguida, o indol (3 mmol) foi adicionado em uma porção. Após 30 minutos, a mistura foi diluída em 20 mL de acetato de etila (AcOEt) e lavada com água (5x 20 mL) seguida de salmoura (1x 20 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto obtido foi purificado por cromatografia em coluna usando uma mistura de AcOEt/Hexano para obtenção do 3-selenocianato-indólico **4a-g**.

4.4. Ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos

Foi realizado um *screening* inicial dos 3-Selenocianatos-indólicos (**4a-g**) frente leveduras do gênero *Candida*, para verificar o potencial antifúngico dos compostos. Após obtenção dos resultados, duas moléculas destacaram-se (**4a** e **4b**), pois apresentaram uma atividade de amplo espectro, com baixas concentrações inibitórias. Nesse sentido, ampliamos o número de isolados a serem avaliados, para cinco isolados de cada espécie (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) e avaliamos a atividade antifúngica destas moléculas frente a fungos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Nannizzia* e *Microsporum*, em cinco isolados de cada espécie.

As soluções referentes a cada composto foram diluídas em DMSO (2%), o restante de volume necessário foi completado com meio RPMI 1640, para obtenção de uma solução na concentração de 100 µg/mL para cada composto. As CIMs dos compostos foram definidas pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com os protocolos M27-A3 (*Candida* spp.) e M38-A2 (fungos filamentosos), ambos padronizados pelo CLSI (2008). Os inóculos foram preparados em solução salina estéril 0,85%, posteriormente

ajustados em espectrofotômetro (GT7220, Global Trade Technology) no comprimento de onda de 530 nm.

A suspensão final de levedura foi obtida após diluições 1:50 e 1:20, sendo a última realizada em meio RPMI para obtenção do inóculo teste duas vezes mais concentrado (1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL), sendo preparados a partir de culturas cultivadas em ágar sabouraud dextrose (SDA) a 35 °C. Esta concentração é diluída 1:1 quando inoculada nos poços, resultando em um inóculo final ($0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$). As microplacas foram incubadas a 35 °C por dois dias (48h) e a leitura da CIM foi realizada visualmente.

A suspensão final contendo os conídios de fungos filamentosos foi obtida após diluições 1:50 em meio RPMI, para obtenção do inóculo teste duas vezes mais concentrado (2×10^3 a 6×10^3), sendo preparados a partir de culturas cultivadas em ágar batata dextrose (PDA) a 32 °C durante sete dias. Esta concentração é diluída 1:1 quando inoculada nos poços, resultando em um inóculo final (1×10^3 a 3×10^3 UFC/mL). As microplacas foram incubadas a 32 °C por quatro dias (96h) e leitura da CIM foi realizada visualmente.

Todos os ensaios foram realizados em meio RPMI 1640, contendo L-glutamina (sem bicarbonato de sódio), tamponado a pH 7,0 com MOPS 0,165 mol/L, em duplicata. Em paralelo foram realizados o controle de esterilidade (controle negativo) e o controle positivo para viabilidade de células fúngicas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% o crescimento fúngico quando comparada ao controle positivo, por meio da leitura visual (CLSI, 2008).

4.5. Mecanismo de ação

4.5.1. Ligação ao ergosterol exógeno

Para avaliar a capacidade dos 3-Selenocianatos-indólicos (**4a** e **4b**) formarem um complexo com o esterol da membrana celular fúngica, foi realizado o ensaio de ergosterol exógeno (Escalante et al., 2008). A técnica de determinação exógena (qualitativa) de ergosterol foi executada com e sem a adição de ergosterol (Sigma-Aldrich) no inóculo fúngico, em concentrações de 100, 150, 200 e 250 mg/mL, para *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (RL37), *C. krusei* (CK01), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (RL13), *T.*

rubrum (TRU45), *T. mentagrophytes* (TME46) e *N. gypsea* (MGY50). A CIM determinada na ausência e presença de ergosterol exógeno foi realizada conforme os protocolos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008). O ergosterol foi dissolvido em dimetilformamida (0,1%) (Sigma-Aldrich) e a solução foi adicionada ao meio RPMI-1640 (contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0, Sigma-Aldrich). As microplacas foram incubadas a 35 °C por 48h para *Candida* spp. e 96h para os dermatófitos. As CIMs foram determinadas visualmente pela ausência ou presença de crescimento fúngico. A anfotericina B foi usada como controle e o ensaio foi realizado em duplicata. Se os compostos apresentarem afinidade pelo ergosterol exógeno, impedindo a ligação ao ergosterol endógeno, espera-se que a CIM aumente.

4.5.2. Ensaio de proteção do sorbitol

Para verificar se os 3-Selenocianatos-indólicos (**4a** e **4b**) afetam a integridade da parede celular fúngica, foi realizado o ensaio de proteção do sorbitol (Escalante et al., 2008). As CIMs dos compostos foram determinadas com e sem adição de sorbitol (0,8 M, Sigma-Aldrich) no inóculo fúngico, para *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (RL37), *C. krusei* (CK01), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (RL13), *T. rubrum* (TRU45), *T. mentagrophytes* (TME46) e *N. gypsea* (MGY50). A CIM determinada na ausência e presença de sorbitol foi realizada conforme os protocolos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008). O sorbitol foi dissolvido no meio de cultura RPMI-1640 (contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0, Sigma-Aldrich). As microplacas foram incubadas a 35 °C e as CIMs foram determinadas visualmente pela ausência ou presença de crescimento fúngico, no segundo e no sétimo dia de incubação para as leveduras, e no quarto e oitavo dia de incubação para os fungos filamentosos. A anidulafungina foi usada como controle e o ensaio foi realizado em duplicata. O sorbitol impede a lise e a ruptura da parede celular fúngica, por ser um protetor osmótico da parede. Nesse sentido, se o alvo dos compostos for a parede celular, espera-se que a CIM aumente na presença do sorbitol.

4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Apenas uma cepa fúngica - *C. albicans* (ATCC 18804) foi selecionada para realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV). O selenocianato-indólico **4a** foi avaliado em uma concentração de 3,1 mg/mL (concentração subinibitória). Após a lavagem das células fúngicas com solução salina de tampão fosfato (PBS), as mesmas foram expostas ao glutaraldeído (2,5%, tipo 1, Sigma Aldrich), diluído com cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2, Sigma Aldrich) e mantidas por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) contendo sacarose (0,2 M) e MgCl₂ (2 mM). As células aderidas foram desidratadas por imersão em gradientes de soluções de acetona. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico (EM CPD 300, Leica), imediatamente após a desidratação, foram revestidas por pulverização catódica com uma camada de ouro-paládio de 15-20 nm e visualizadas usando um microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss EVOs MA10, Oberkochen, Alemanha) operando a 10 kV (Moraes et al., 2015).

4.7. Time-kill

O ensaio do Time-kill foi realizado conforme descrito por Klepser et al. (1998) e Ghannoum et al. (2013) para *Candida* spp. e dermatófitos, respectivamente. Em tempos pré-determinados, avaliamos a cinética dos compostos **4a** e **4b** em uma relação dose-resposta, pelo ensaio do tempo de morte celular, que tem como objetivo demonstrar se as moléculas apresentam um perfil fungicida ou fungistático. Avaliamos a relação dose-resposta em uma cepa representativa de cada gênero estudado (*C. albicans* ATCC 18804 e *T. rubrum* TRU 45), expostas a diferentes concentrações dos compostos. A atividade dos compostos foi avaliada contra os isolados em 0, 4, 12, 24 e 48h (*C. albicans*) e 0, 8, 12, 24 e 48h (*T. rubrum*) nas concentrações de MIC/2, MIC, MICx2 e MICx4.

Os inóculos fúngicos foram padronizados no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530 nm. Para *C. albicans* foi realizada uma diluição de 1:10 em meio RPMI, para obtenção de um inóculo final na concentração de aproximadamente 1 a 5 x 10⁵ UFC/mL. Já para o inóculo de *T. rubrum*, foi feita

uma diluição de 1:50 em meio RPMI, para obtenção de um inóculo final na concentração de 1 a 3×10^3 UFC/mL.

Em cada um dos tempos pré-determinados para cada gênero fúngico, uma alíquota de 100 μ L de cada solução teste foi diluída em água estéril até 10^{-5} , para permitir a contagem das UFC no final do experimento. Após a diluição, foram inoculados 20 μ L de cada amostra em ágar SDA. As placas foram incubadas a 35 °C/48h para *C. albicans* e 32 °C/96h para o *T. rubrum*. Após o período de incubação, realizou-se a contagem das UFC e os resultados foram expressos em \log_{10} UFC/mL. Um efeito fungicida é caracterizado por uma diminuição de $\geq 99,9\%$ em \log_{10} UFC/mL, em comparação com o inóculo inicial (tempo zero). O ensaio foi realizado em duplicata e um controle positivo de viabilidade de células fúngicas foi utilizado em paralelo.

4.8. Toxicidade (ensaios de viabilidade celular, genotoxicidade e mutagenicidade)

Para realização dos ensaios de toxicidade, foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pampa o protocolo de número 27045614.0.0000.5323. O procedimento foi realizado com o consentimento do voluntário e assinatura do termo de aceitação de sua participação na pesquisa. A cultura de células foi preparada pela coleta de 1 mL de sangue venoso, coletado por punção venosa de um voluntário adulto jovem, maior de 18 anos, sem uso de medicação. Os linfócitos foram obtidos por gradiente de centrifugação e imediatamente foram transferidos para o meio de cultura, contendo 9 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina. Os frascos de cultura de células foram armazenados a 37 °C por 72h. O controle negativo foi preparado com 500 μ L de tampão PBS 7,4 e o controle positivo com 3 μ g/mL de bleomicina. Os compostos **4a** e **4b** foram avaliados na concentração de 32 μ g/mL.

A viabilidade celular foi determinada com base na perda de integridade da membrana leucocitária medida pelo método do azul de tripan, que é um método amplamente utilizado para verificar citotoxicidade. As células danificadas absorvem o azul de tripan para o citoplasma, por outro lado, as

células viáveis permanecem intactas. As células coradas (mortas) e incolores (vivas) são contabilizadas em câmara de Neubauer (Avelar-Freitas et al. 2014) Cada grupo foi analisado em triplicata. Cerca de 100 células foram analisadas por lâmina para cada grupo em uma câmara de Neubauer com aumento de 400x. O teste do micronúcleo foi realizado em um microscópio (aumento de 1000x) onde 300 células foram contadas e classificadas quanto à quantidade de células mononucleares com a presença de micronúcleo. A metodologia foi realizada de acordo com Schmid (1975) e Fenech (2000), com modificações.

Finalmente, o ensaio do cometa seguiu as diretrizes para o uso da técnica (Tice et al., 2000; Nadin, Vargas-Roig & Ciocca, 2001; Hartmann et al., 2003). No total, 100 nucleoides por lâmina (em triplicata para cada grupo) foram selecionados e analisados. Os nucleoides foram classificados de acordo com o comprimento da cauda para posterior cálculo do índice de danos ao DNA. Para classificação, os nucleoides receberam pontuações de 0 (sem migração) a 4 (migração máxima).

4.9. Teste em membrana corioalantoica de ovo de galinha (HET-CAM)

Para avaliar o potencial irritante dos compostos **4a** e **4b**, foi realizado o ensaio em membrana corioalantoica de ovo de galinha (HET-CAM). Ovos brancos frescos e férteis foram mantidos em condições de incubação otimizadas (38-39 °C, 55-60% de umidade, 10 dias). No dia 10, a casca do ovo foi removida com uma ferramenta rotativa (Dremel, WI). Posteriormente, 0,3 mL de cada composto (32 µg/mL, diluído em solução de DMSO 0,5%), bem como os controles (controle negativo: NaCl 0,9%; controle positivo: NaOH 0,1 M) foram adicionados à membrana corioalantoica dos ovos. Em seguida, os ovos foram observados continuamente por 5 minutos, para verificar o aparecimento de hemorragia, lise e coagulação. Além disso, a gravidade de cada reação após 1 e 5 minutos foi registrada. A partir disso, o score de irritação (IS) foi calculado usando a equação abaixo. O score de irritação, quando baseado por esta fórmula, apresenta valor máximo de 21. O seguinte critério de classificação é utilizado: não irritante ou praticamente não irritante (0 a 4,9); irritação moderada (5 a 8,9) e irritação grave ou severa (9 a 21). O ensaio foi

realizado em triplicata. A metodologia foi realizada de acordo com o Comitê de Coordenação Interagências sobre a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, 2010):

$$IS = \left(\left(\frac{(301 - \text{Hemorrhage Time})}{300} \right) \times 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Lysis Time})}{300} \right) \times 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Coagulation Time})}{300} \right) \times 9 \right)$$

4.10. Padronização de modelo de onicomicose

4.10.1. Formulações antifúngicas utilizadas no experimento

O composto **4a** (0,5 mg/mL e 5 mg/mL) e a terbinafina (0,5 mg/mL) foram selecionados como antifúngicos para serem incorporados separadamente em um verniz para unhas (nitrocelulose, tolueno sulfonamida, acetato de etila, acetato de butila, óleo de mamona, álcool isopropílico e dimeticona), que foi produzido pela Bonatto Ind. Ltda (Cachoeirinha, Brasil). Este verniz também foi avaliado de forma isolada, para verificar uma possível atividade antifúngica. O composto **4a** foi diluído em DMSO (2%) e incorporado ao verniz através de homogeneização, para obtenção de uma formulação a base de esmalte na concentração de 0,5 e 5 mg/mL. Da mesma forma foi preparada a formulação contendo terbinafina, mas com concentração final de 0,5 mg/mL. Concentrações mais elevadas em relação à CIM foram necessárias para avaliar a atividade antifúngica em modelo *ex vivo*.

4.10.2. Preparo dos discos de cascos suínos

Os cascos suínos foram cedidos pela YARGO Suinocultura. Para a preparação dos discos, as patas suínas foram autoclavadas por 15 minutos a uma temperatura de 121 °C, para facilitar a extração dos cascos. Após a extração, os cascos foram mantidos em uma prensa por 24h, para a obtenção de discos planos, que foram seccionados no diâmetro de 9,5 mm, com o auxílio de um molde metálico. Uma lixa foi utilizada para padronizar a espessura dos discos, na média de 1 mm. O índice de variação foi calculado, sendo inferior a 2,2%. Antes de iniciar os experimentos, os discos foram autoclavados por 15 minutos, a uma temperatura de 121 °C.

4.10.3. Infecção fúngica *ex vivo* em casco suíno

Os discos de casco suíno (n=4 por grupo) foram infectados pelo contato com *T. rubrum* (TRU 45), após inoculação de 100 µL da suspensão fúngica (10^5 UFC/mL) em ágar Batata dextrose (PDA), com auxílio de uma alça de Drigalski. O período de infecção foi de cinco dias a uma temperatura de 32 °C. Após a infecção, os discos foram transferidos para uma placa contendo SDA para dar início ao tratamento. No período de tratamento, três gotas das formulações a base de esmalte foram aplicadas diariamente durante sete dias. A formulação livre de fármaco também foi avaliada.

Após o período de tratamento, cada disco foi transferido para um tubo contendo 2 mL de solução salina, que foi agitado em vórtex por 1 min e levado ao sonicador por 20 minutos, para desprender as células fúngicas. Uma alíquota de 20 µL desta suspensão foi inoculada em placas de PDA e incubada por cinco dias a 32 °C. O ensaio foi realizado em quadruplicata e ao final do experimento, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). O controle positivo (sem tratamento) foi realizado em paralelo. A presença de recidiva foi analisada conforme descrito por Lusiana et al. (2013), pela transferência dos discos para placas de PDA, incubados por um período de sete dias a 32 °C, para verificar a presença de células fúngicas remanescentes no interior dos discos após os tratamentos.

4.10.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo método Anova seguido por Tukey, através o software GraphPad Prism. Os dados foram transformados em log.

4.11. Modelo *ex vivo* de infecção fúngica em pele suína

Para verificar a atividade do composto **4a** no tratamento de uma infecção fúngica na pele, foi projetado um modelo *ex vivo* de dermatofitose utilizando a orelha de suínos. O modelo foi proposto de acordo com o estudo de Corzo-León, Munro e MacCallum (2019), com modificações. Utilizamos recortes de pele da orelha suína, seccionados em 1 cm². O inóculo fúngico de *T. mentagrophytes* foi preparado através da contagem de conídios em câmara de Neubauer, para obter uma suspensão fúngica na concentração de 10^8

células/mL. Antes de iniciar o ensaio, os recortes da orelha suína foram desinfetados por imersão em álcool 70% durante um minuto, na sequência, foram depositados em placas de poliestireno de seis poços. Com o auxílio de uma agulha a superfície da pele foi perfurada, e em seguida 20 µL do inóculo fúngico foi distribuído de forma uniforme sobre a superfície da pele. Em cada poço foi adicionado 1 mL do meio de cultura preparado no laboratório (RPMI, estreptomicina/penicilina (1%) e soro fetal bovino (1%)). O meio de cultura foi adicionado cuidadosamente para cobrir somente a derme, evitando o contato com a epiderme.

As placas foram armazenadas em estufa a 37 °C durante três dias para o estabelecimento da infecção, com substituição diária do meio de cultura. Esse período de três dias de infecção foi estabelecido de acordo com Duek et al (2004), que demonstrou que nesse período de infecção os microconídios de *T. mentagrophytes* já mostram aderência na pele humana. Após, foi iniciado o tratamento com miconazol em creme (Vodol) e com o composto **4a** (2 mg/mL) diluído em solução salina, que foram aplicados na superfície da pele. Após 24h, cada recorte de pele foi transferido para um tubo do tipo Falcon contendo 2 mL de salina, suficiente para cobrir a pele. Os tubos foram levados ao vórtex por 1 minuto e ao sonicador por 20 minutos, com o objetivo de desprender células fúngicas aderidas na pele, na sequência, uma alíquota (10 µL) de cada tubo Falcon foi inoculada com a alça de Drigalsky em ágar Sabouraud com cicloheximida. O ensaio foi realizado em triplicata e ao final do experimento foi possível contar as unidades formadoras de colônia (UFC). Em paralelo foi utilizado o controle positivo (sem tratamento) e o controle negativo de esterilidade.

5.5. Resultados não apresentados na forma de artigo.

Modelo *ex vivo* de infecção fúngica em pele suína

No modelo *ex vivo* de dermatofitose, observamos que foi possível estabelecer um processo infeccioso em três dias, após a perfuração da superfície da pele com agulha, seguida de inoculação da suspensão fúngica. Observe na Figura 10 o crescimento fúngico cobrindo a superfície da pele.



Figura 10: Processo infeccioso do *T. mentagrophytes* em pele suína.

O tratamento com miconazol em creme (Vodol) e com o composto **4a** (2 mg/mL) diluído em solução salina foi iniciado após os 3 dias e avaliado após 24h. Os resultados observados após o período de tratamento podem ser observados na Figura 11. O miconazol inibiu completamente o crescimento fúngico, enquanto que o composto **4a** aparentemente apresentou pouca inibição. O controle positivo apresentou o crescimento esperado, comprovando o estabelecimento da infecção fúngica, e no controle negativo foi observado o crescimento da microbiota da pele suína, que não foi capaz de ser removida pela imersão em álcool 70%. Esses resultados revelaram que o método *ex vivo* de infecção em pele utilizando orelha suína é promissor para o estabelecimento de uma infecção fúngica, bem como para a triagem de novos agentes antifúngicos. A grande vantagem em utilizar a pele suína é a similaridade com a pele humana, além disso, é um modelo alternativo ao uso de animais em modelos *in vivo*. É importante salientar que estes resultados observados são preliminares e que o método possui algumas desvantagens, como a dificuldade em manter a pele conservada, por esse motivo, não foi possível avaliar o período de tratamento por mais tempo.

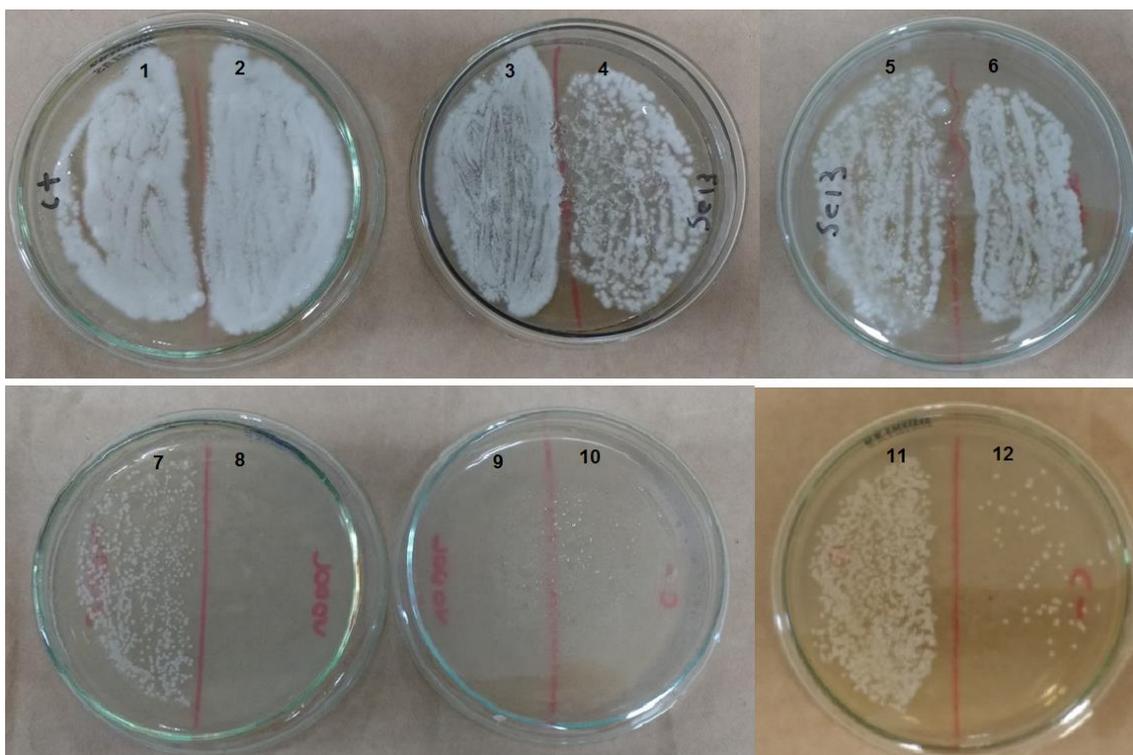


Figura 11: Contagem de UFC/mL após o tratamento com o composto **4a** e com o miconazol em creme (Vodol). Legenda: 1,2,3 = controle positivo; 4,5,6 = Tratamento com o composto **4a**; 7,8,9 = Tratamento com miconazol (Vodol); 10,11,12 = Controle negativo.

Como perspectivas, é importante que sejam realizadas diluições para quantificar de forma precisa as UFC/mL após o período de tratamento. Também é importante que sejam avaliados outros agentes antifúngicos tópicos disponíveis.

6. DISCUSSÃO GERAL

Em virtude dos frequentes relatos de infecções fúngicas causadas por *Candida* spp., muitas vezes fatais para os pacientes, bem como os casos de dermatofitoses recorrentes e resistentes ao tratamento, a proposta deste estudo foi verificar o potencial terapêutico de uma nova classe de moléculas, os 3-Selenocianatos-indólicos, frente a diferentes espécies de *Candida* e fungos queratinofílicos. Essa classe de moléculas possui em comum a presença do grupamento SeCN (selenocianato) na terceira posição do anel indol. As substituições nessa posição são indicadas para obtenção de compostos com atividade antimicrobiana (Chadha & Silakari, 2017). Após o *screening* de uma série de compostos pertencentes à esta classe contra *Candida* spp., sete foram selecionados, pois apresentaram atividade antifúngica. Entre os sete compostos, dois destacaram-se pois apresentaram as menores CIMs, sendo eles os compostos 4a e 4b, que possuem em suas estruturas os substituintes H e Br na quinta posição do anel indol, respectivamente. A presença do Iodo (4c) ou do grupo funcional CO₂CH₃ (4d) nesta mesma posição reduziu a atividade antifúngica. Os compostos 4a e 4b demonstraram efetividade contra todas as espécies de *Candida* analisadas: *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (RL37), *C. krusei* (CK01), *C. tropicalis* (CT750), e *C. parapsilosis* (RL13). Os valores de CIMs encontrados para esses dois compostos estavam na faixa de 3,12-6,25 µg/mL (4a) e 1,56-6,25 µg/mL (4b), similar aos valores encontrados para o fluconazol (0,5-8 µg/mL).

Com esses excelentes resultados preliminares dos compostos 4a e 4b, continuamos os estudos com ambos, ampliando o número de microrganismos a serem analisados, frente a 25 isolados de *Candida* e 15 isolados de fungos dermatófitos. Mais uma vez os resultados foram surpreendentes, os dois compostos apresentaram um amplo espectro de ação, tanto para as espécies de *Candida* (CIMs 1,5-12,5 µg/mL), quanto para os dermatófitos *Nannizzia gypsea*, anteriormente conhecido como *Microsporium gypseum* (0,1-12,5 µg/mL), *Trichophyton mentagrophytes* (0,7-12,5 µg/mL) e *Trichophyton rubrum* (0,4-3,1 µg/mL).

Estes resultados são consistentes com outros estudos publicados pelo nosso grupo de pesquisa, que mostraram o potencial antifúngico de outras

classes de selenocianatos, como os Selenocianatos-alílicos. Essa classe revelou resultados promissores contra *Fusarium* spp. com MICs variando entre 4 a 64 $\mu\text{g/mL}$ (Batista et al., 2017), e contra *Candida* spp. com a média dos valores de CIMs variando entre 1,42 a 47,22 $\mu\text{g/mL}$ (Bazana et al., 2020), demonstrando o potencial dos compostos organoselênio, inclusive para fungos filamentosos não-dermatófitos de difícil tratamento, como o *Fusarium* spp. Muitos estudos revelaram o potencial antimicrobiano de compostos derivados do selênio, como no estudo de Loreto et al. (2011), que demonstrou a atividade antifúngica de disseleneto de difenila (PhSe) contra uma variedade de gêneros fúngicos, porém com valores de MIC superiores ao encontrado em nosso estudo para *Candida* spp. (4- >64 $\mu\text{g/mL}$).

O selênio também já foi incorporado a uma nanopartícula (SeNP) e avaliado contra o fungo *Pyricularia grisea*, demonstrando diminuição do diâmetro do micélio fúngico em relação ao controle (Controle: $77,2 \pm 2,1\text{mm}$; SeNP: $64,0 \pm 1,4$; $52,4 \pm 2,0$ e $36,8 \pm 1,6$). Essas nanopartículas também inibiram a infecção de folhas de pimentão e tomate causada por *Colletotrichum capsici* e *Alternaria solanæ*, sendo uma potente ferramenta contra pragas agrícolas (Joshi et al., 2019). Outras classes de moléculas contendo o selênio, como os selenoésteres e selenoanidridos, foram avaliadas contra *Candida* e revelaram moderada efetividade: *C. krusei* (50->200 $\mu\text{g/M}$) e *C. parapsilosis* (100->200 $\mu\text{g/M}$) (Spengler et al., 2019).

Publicações recentes demonstraram as promissoras propriedades farmacológicas de compostos orgânicos de selênio sintéticos (Al-Tamimi et al., 2019; Spengler et al., 2019). Ensaio clínico com o ebselen, por exemplo, estão sendo realizados atualmente para tratar o transtorno bipolar (Sharpley et al., 2020). Esse composto também foi registrado em dois ensaios clínicos para tratar pacientes com COVID-19 (Haritha et al., 2020). O ethaselen, que é um derivado do ebselen, está em fase de recrutamento de um ensaio clínico, para o tratamento de câncer de pulmão. O ebselen ainda não foi aprovado para o tratamento de uma doença específica, entretanto, sua segurança para os seres humanos indica que os compostos organoselênios podem ser opções terapêuticas promissoras (Nogueira, Barbosa & Rocha, 2021). Todos esses trabalhos exibem a versatilidade farmacológica de compostos de selênio, que

precisam ser explorados para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos.

A estrutura básica dos 3-Selenocianatos-indólicos é composta pelo indol, que possui o grupamento funcional SeCN no anel de pirrol. O indol é conhecido como uma estrutura privilegiada e versátil, sendo um excelente composto heterocíclico, por apresentar diversas propriedades farmacológicas (Kumari & Singh, 2019). Esse composto químico orgânico (C₈H₇N), possui em sua estrutura um anel benzeno, fundido ao anel de pirrol que contém nitrogênio. É relatado como um importante bloco de construção em química medicinal (Kaushik et al., 2013).

Os indóis podem ser obtidos de forma natural, oriundos da vinca, da árvore *Alstonia scholaris*, da fruta *Melodinus cochinchinensis*, da esponja marinha *Topsentia*, entre outras fontes. A atividade farmacológica dos derivados naturais de indóis, motivou a síntese de indóis sintéticos, para a projeção de novos compostos contra uma diversidade de doenças (Kaushik et al., 2013). Nesse sentido, as propriedades promissoras dos indóis, aliadas às propriedades farmacológicas já elucidadas pelos derivados de selênio, foram os pilares que levaram ao desenvolvimento de uma nova classe de moléculas, os 3-Selenocianatos-indólicos. A combinação dessas estruturas químicas, demonstraram resultados pré-clínicos favoráveis para o desenvolvimento de novos fármacos, confirmando que o indol é uma estrutura farmacêutica importante para a prospecção de novos agentes antifúngicos.

O desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas é um grande desafio, pois com exceção da parede celular fúngica, os fungos são metabolicamente semelhantes às células de mamíferos, resultando em poucos alvos específicos para os agentes patogênicos (Ostrosky-Zeichner et al., 2010). A membrana da célula fúngica contém o ergosterol, um esterol que regula a fluidez, a assimetria e a integridade da membrana (Kathiravan et al., 2012). O alvo mais importante dos antifúngicos ainda é a biossíntese do ergosterol (Dhingra & Cramer, 2017). Em comparação com o colesterol, que é o esterol presente na membrana das células de mamíferos, o ergosterol diferencia-se por uma ligação dupla extra entre carbono-carbono, presente no segundo anel de esterol, além de possuir uma estrutura ligeiramente diferente no grupo acila (Luchini et al., 2020). Os

resultados obtidos pelo ensaio de ligação ao ergosterol em nosso estudo, revelaram que os compostos 4a e 4b não ligam-se à membrana da célula fúngica, pois não foi observado um aumento de CIM na presença de diferentes concentrações de ergosterol, em comparação ao aumento da CIM que foi observada na presença de anfotericina B.

Um possível mecanismo de ação na parede da célula fúngica também não foi evidenciado pelos compostos 4a e 4b, já que os resultados obtidos pelo ensaio de proteção do sorbitol não demonstraram um aumento de CIM na presença de sorbitol, em comparação com o que foi observado ao avaliar a anidulafungina. Esses resultados corroboram com o estudo de Bazana et al. (2020) ao avaliarem a classe dos Selenocianatos-alílicos frente *Candida* spp, que não identificaram um mecanismo de ação na membrana celular ou na parede celular. Em contrapartida, um mecanismo de ação na membrana celular de *Fusarium* spp. foi identificado para a classe dos Selenocianatos-alílicos (Batista et al., 2017), sugerindo um mecanismo de ação diferenciado entre leveduras e fungos filamentosos.

Uma característica importante de inibidores da parede celular fúngica é que o efeito antifúngico é revertido em um meio constituído por um estabilizador osmótico, como o sorbitol (Escalante et al., 2008). O aumento no valor da CIM na presença de sorbitol, refere-se à ligação de compostos ao sorbitol sugerindo um efeito inibitório na síntese ou na estrutura da parede celular. É importante ressaltar que métodos enzimáticos também podem ser utilizados para verificar uma possível ação de antifúngicos na biossíntese da parede celular, que possuem como alvo a 1,3- β -glicano sintase e a quitina sintase, enzimas responsáveis por catalisar a síntese dos polímeros mais importantes da parede celular fúngica (Escalante et al., 2008).

Nossos ensaios de toxicidade revelaram que os compostos 4a e 4b não são citotóxicos nem mutagênicos, porém, através do ensaio cometa foi observado um dano significativo no DNA. Esse efeito observado pode comprometer a utilização dos compostos de forma sistêmica, mas não compromete a aplicação de forma tópica. Esse dano no DNA pode indicar um possível mecanismo de ação no núcleo celular, que tem como alvo os ácidos nucleicos, no entanto, essa hipótese não foi confirmada. O ebselen, composto

organoselênio, também não teve o seu mecanismo de ação completamente compreendido, no entanto, Azad et al. (2012) propuseram que esse composto altera proteínas nucleares em leveduras, gerando dano no DNA. A técnica de espectroscopia de força é considerada a mais moderna para verificar a interação de fármacos com o DNA e, a eletroforese em gel, quando utilizada em conjunto, complementa esta análise (Chaurasiya et al., 2010; Rocha, 2015; Bazoni, Moura & Rocha, 2020), podendo ser uma alternativa para confirmar a hipótese de danos a nível nuclear. É importante ressaltar que uma concentração mais elevada dos compostos foi analisada nos ensaios de toxicidade em relação aos CIMs obtidos pelos ensaios de suscetibilidade.

Mesmo na presença de determinada toxicidade, muitos antifúngicos comerciais não são descartados, já que o arsenal de fármacos é limitado. Os imidazóis, por exemplo, apresentam problemas de toxicidade e de biodisponibilidade, por esse motivo, muitos imidazóis são administrados de forma tópica (Ostrosky-Zeichner et al., 2010). Como as duas moléculas selecionadas em nosso estudo apresentaram um perfil não irritante pelo ensaio HET-CAM, decidimos avaliar a eficácia do composto 4a de forma tópica, inicialmente em um modelo *ex vivo* de onicomicose utilizando o casco suíno, que será discutido posteriormente. O ensaio HET-CAM é um ensaio que pode ser útil para avaliar o potencial irritante de compostos em membrana corioalantoica de embrião de galinha. É um teste *in vivo* acessível e de fácil realização para a triagem de novos fármacos (Krenn & Paper, 2009). Além do potencial irritante, esse teste pode verificar se novos compostos causam sangramento vascular, lise e coagulação da membrana (Wilson & Steck, 2000). Para realizar o HET-CAM não é necessária a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa, sendo um método alternativo aos testes que utilizam animais (Öztürk et al., 2020).

Na medida em que novos antifúngicos são desenvolvidos, torna-se necessário determinar as propriedades fungicidas e farmacodinâmicas desses novos agentes. Nesse sentido, o método que avalia a viabilidade celular em tempos predeterminados, conhecido como *Time-kill assay*, pode ser empregado. Esse método é capaz de fornecer informações referentes a extensão da atividade fungicida, bem como a relação entre a concentração do

antifúngico e o efeito gerado (Ghannoum et al., 2013). Para a realização desse ensaio, nos baseamos nos valores de CIM dos compostos 4a e 4b obtidos pela microdiluição em caldo para *C. albicans* (ATCC 18804) e *T. rubrum* (TRU 45). Nossos dados revelaram que o composto 4a possui um perfil fungicida para os dois gêneros de fungos avaliados. Em contrapartida, o composto 4b apresentou um perfil fungistático em *C. albicans*, pois foi observada uma redução de unidades formadoras de colônia (UFC), seguida de uma proliferação celular.

Os triazóis são exemplos de antifúngicos fungistáticos em espécies de *Candida* (Zhanel et al., 2001). Na revisão de Kumar et al. (2018), os autores demonstraram que em pacientes não neutropênicos com infecções invasivas por *Candida* spp., o uso de agentes fungicidas resulta em uma taxa de cura inicial e redução da persistência microbiana superiores, em relação à terapia fungistática com triazóis. Entretanto, mesmo com essas diferenças, a taxa de sobrevivência dos pacientes é praticamente a mesma nos dois grupos. Uma provável explicação para isso envolve a toxicidade renal gerada pela anfotericina B, por exemplo, que é fungicida (Kumar et al., 2018). É importante ressaltar que em pacientes imunocomprometidos, os antifúngicos fungistáticos podem não ser eficazes, já que esses agentes atuam em conjunto com o sistema imunológico do paciente para combater os agentes patogênicos.

Assim como o composto 4a, o 4b revelou uma atividade fungicida contra o *T. rubrum* (TRU 45) após 8h de tratamento com a dose mais elevada (CIMx4). Em doses mais baixas (CIM e CIMx2) após 8h de tratamento, foi observada uma proliferação celular, sugerindo a necessidade de uma nova dose terapêutica. Nossos resultados revelaram que a atividade fungicida do composto 4a frente a *C. albicans* (ATCC 18804) e do composto 4b frente o *T. rubrum* (TRU 45), é dependente da dose, já que quanto maior a concentração dos compostos, maior é a redução de UFC. A microscopia eletrônica de varredura, que foi realizada para analisar a *C. albicans* (ATCC 18804) exposta ao composto 4a (concentração subinibitória: 3,1 µg/mL) por 48h, revelou uma redução expressiva mas não completa das hifas e das células leveduriformes, demonstrando a necessidade de uma concentração mais elevada para alcançar a inibição completa do fungo.

Vale ressaltar que o *Time-kill* foi padronizado pelo CLSI para avaliar o perfil farmacodinâmico dos antimicrobianos contra bactérias (CLSI, 1999), no entanto, não há um método padronizado para avaliar os antifúngicos. Nesse sentido, Klepser e colaboradores (1998) propuseram um método para avaliar a viabilidade celular de *Candida* spp. expostas a diferentes antifúngicos, em tempos determinados, sendo esse o método utilizado em nosso estudo. Os autores comentam que para bactérias, o inóculo utilizado no *Time-kill* é semelhante ao utilizado no ensaio de microdiluição em caldo (5×10^5 UFC/mL), facilitando as comparações entre ambos os testes. Ao avaliar as leveduras, os autores verificaram que a concentração do inóculo utilizada no ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos não é viável no *Time-kill*, em função de uma limitação para detectar uma redução de 99,9% de UFC, já que o inóculo fúngico é menos concentrado em relação às bactérias (Klepser et al., 1998). Por esse motivo, o estudo recomenda que um inóculo de aproximadamente 10^5 UFC/mL seja empregado para avaliar os antifúngicos no ensaio de tempo de morte para *Candida* spp. Para fungos dermatófitos, Ghannoum et al. (2013) demonstram que um inóculo de aproximadamente 10^3 UFC/mL é eficaz, sendo essa a concentração que é avaliada no ensaio de suscetibilidade, e que foi empregada em nosso estudo.

O potencial antifúngico de amplo espectro verificado pelos nossos compostos, aliado à necessidade de desenvolvimento de novas opções de tratamento para infecções fúngicas sistêmicas e superficiais, como a onicomicose, que apresenta altas taxas de recidiva, nos conduziram ao desenvolvimento de um modelo *ex vivo* de onicomicose. Sabemos que a utilização de modelos murinos na pesquisa ainda é uma tendência atual e existem varias razões para isso, como a semelhança genética e fisiológica dos animais não humanos com os humanos, bem como pelo padrão de envelhecimento semelhante aos humanos. Essas similaridades tornam os métodos *in vivo* essenciais para verificar o padrão de segurança e de eficácia de novos tratamentos antes que sejam aplicados nos seres humanos (Bédard et al., 2020). Entretanto, em 1959 os princípios dos 3Rs foram propostos por Russel e Burch, que inseriram os termos substituição, redução e refinamento do uso de animais na pesquisa (Clark, 2018). Nesse sentido, utilizar modelos

ex vivo de infecções fúngicas quando possível, como o que foi empregado em nosso estudo, torna-se uma alternativa atrativa para verificar a eficiência pré-clínica de novas opções terapêuticas, reduzindo custos, bem como o uso e o sofrimento dos animais em laboratório.

A similaridade entre o casco suíno ou bovino com a unha humana está na presença da queratina, que torna os cascos de animais substitutos atrativos para a unha humana, que muitas vezes são de difícil acesso e necessitam de aprovação pelo comitê de ética (Thatai & Sapra, 2014). No modelo *ex vivo* de onicomicose, selecionamos o composto 4a, já que o mesmo apresentou as menores concentrações inibitórias para os fungos dermatófitos. Nosso estudo revelou que esse composto incorporado a uma base de esmalte foi efetivo na concentração de 5 mg/mL para combater um quadro de onicomicose *ex vivo*. A concentração necessária para erradicar a infecção foi bem maior do que a CIM obtida pelo ensaio de susceptibilidade. Esse fato era esperado, já que no modelo de onicomicose utilizamos um inóculo fúngico mais concentrado, além da presença da queratina no casco, que é uma fonte nutricional para o fungo se desenvolver e estabelecer o processo infeccioso.

A base de esmalte forma um filme na superfície da unha, melhorando a adesão na placa ungueal. Esse filme serve como um depósito de fármaco, que é liberado constantemente (Thatai & Sapra, 2018). Por esse motivo, os esmaltes comerciais contendo agentes antifúngicos são interessantes para o tratamento da onicomicose, pela fácil aplicação e pelo contato direto e prolongado do fármaco com a lesão. Além disso, as formulações tópicas utilizadas no tratamento de infecções fúngicas são opções atrativas, já que não são invasivas e o fármaco é direcionado exatamente para o local da infecção. Os efeitos colaterais comumente observados na terapia sistêmica são eliminados, aumentando a adesão do paciente ao tratamento (Saner, Kulkarni & Pardeshi, 2014).

Evidências recentes demonstraram que a onicomicose possui um prevalência global de aproximadamente 5,5% da população mundial (Gupta et al., 2018; Lipner & Scher, 2019). Um fator importante que favorece a patogênese é a falta de imunidade mediada por células na unidade ungueal, tornando as unhas mais susceptíveis às infecções fúngicas, além das enzimas

produzidas pelos fungos, que degradam a lâmina ungueal (Grover & Khurana, 2014; Lipner & Scher, 2019). A lâmina ungueal humana possui em torno de 0,2 a 0,5 mm de espessura e apresenta em sua constituição camadas de células queratinizadas fortemente ligadas (Vanstone et al., 2019). Em nosso modelo de onicomicose, os cascos suínos foram padronizados em uma espessura média de 1 mm, justamente para preservar esta barreira natural da unha, que dificulta a penetração dos antifúngicos. Esse é outro fator que contribuiu para a necessidade de uma concentração mais elevada do composto 4a, para que o mesmo fosse capaz de penetrar em concentrações eficientes para combater o crescimento do fungo. Esse composto promissor, que foi avaliado de forma pré-clínica inserido em uma base comercial para unhas, favoreceu a fixação da formulação na lâmina ungueal, aumentando o contato entre o composto e o fungo.

A falha terapêutica e a recidiva da onicomicose são relatadas com frequência. Mesmo com a erradicação da infecção, a recidiva pode ocorrer em cerca da metade dos pacientes tratados após um ano ou mais (Tosti & Elewski, 2016). Em nosso modelo de onicomicose, após o período de tratamento, avaliamos a presença de possíveis hifas residuais no interior dos discos, ao transferir esses discos tratados para uma placa de ágar Sabouraud. Essa técnica foi realizada para verificar se mesmo após o tratamento pelo período de sete dias, o fungo voltaria a crescer, mimetizando uma situação de recidiva. Observamos que após o tratamento com o composto 4a, houve crescimento fúngico em dois dos quatro discos, revelando a necessidade de um período mais longo de tratamento para erradicar completamente o fungo. Como esperado, a base livre de fármaco não foi capaz de combater a infecção, pois o fungo voltou a crescer com intensidade nos quatro discos. A terbinafina, que é muito eficaz contra fungos dermatófitos, erradicou completamente a infecção em todos os discos.

Os resultados pré-clínicos obtidos pelo nosso modelo *ex vivo* de onicomicose, revelaram a potente ação antifúngica do composto 4a para combater um quadro de onicomicose. Conforme abordado anteriormente, nosso composto foi incorporado em uma base de esmalte comercial, que revelou resultados satisfatórios. Entretanto, como perspectivas, seria

interessante desenvolvermos uma formulação própria contendo o composto 4a. Esse estudo, além de demonstrar o potencial antifúngico de uma nova molécula, também serve como um modelo que pode ser empregado de forma pré-clínica para analisar novos fármacos, reduzindo o uso de animais na pesquisa. Aliado a isso, foi possível desenvolver um modelo de onicomicose utilizando o casco suíno, superando diversas desvantagens observadas nos modelos que utilizam unhas pulverizadas, que não possuem a barreira natural que é a unha, bem como os modelos que utilizam recortes de unhas ou unhas de cadáveres humanos, que não possuem uma espessura padronizada (Schaller et al., 2009; Flores et al., 2013; Ghannoum, Sevin & Sarkany, 2016).

Alguns pacientes com onicomicose sentem dor no local da lesão, causando dificuldades para caminhar ou calçar os sapatos e, além disso, a onicomicose pode causar constrangimento social. Muitos pacientes não falam sobre o assunto com o médico, já que a localização da infecção pode estar oculta e acreditam que seja um problema trivial ou em virtude de algum cosmético. Por isso, é importante que os médicos perguntem para os seus pacientes sobre possíveis problemas nas unhas e examinem tanto as unhas dos pés como as das mãos (Gupta et al., 2020). A suspeita de onicomicose é baseada nas características típicas da infecção, que inclui a descoloração das unhas, a hiperqueratose, a presença de detritos subungueais, bem como a onicolise (Scher & Tavakkol, 2007). O diagnóstico micológico pode ser confirmado pela realização do exame micológico direto (EMD), utilizando hidróxido de potássio (KOH), exame histopatológico aplicando a coloração de ácido periódico-Schiff (PAS), a cultura dos fungos ou a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Leung et al., 2020). No entanto, a combinação do EMD com a cultura é o método clássico empregado nos laboratórios de análises clínicas para o diagnóstico micológico, pelo baixo custo, praticidade e precisão dos resultados.

O estudo retrospectivo que realizamos em um laboratório de análises clínicas na cidade de Porto Alegre/RS nos forneceu evidências sobre a importância da cultura no diagnóstico micológico, já que em muitos casos não é possível verificar estruturas fúngicas no EMD, o que pode gerar um resultado falso negativo. Nossos resultados revelaram que a cultura é mais sensível e

específica do que o EMD, contrapondo alguns estudos que relatam o oposto, ou seja, maior sensibilidade do EMD (Souza et al., 2012; Azambuja et al., 2014; Veasey et al., 2017). Essa diferença de sensibilidade observada em nosso trabalho pode estar relacionada com diferenças no número amostral e no tipo de amostra, pois analisamos 1603 amostras, sendo que 1108 foram positivas ou no EMD ou na cultura, ou em ambos, lembrando que em nosso estudo avaliamos amostras de unha, pele, couro cabeludo, cabelo e uretral. Os trabalhos mencionados que classificam o EMD como mais sensível, analisaram 890, 100 e 171 amostras, somente de onicomicose.

No estudo de Zanardi et al. (2008), 40 pacientes com onicomicose foram analisados e os autores concluíram que a sensibilidade do EMD e da cultura são equivalentes. Já no estudo de Youssef et al. (2018), foram analisados 3.458 amostras micológicas de unhas, que apresentaram o EMD positivo em 3.284 amostras (95%), a cultura positiva em 2.409 amostras (69,6%) e o exame direto em combinação com a cultura, ambos positivos, em 2.235 casos (64,6%). Alguns fatores podem contribuir para um resultado negativo na cultura e positivo no EMD, como semear uma amostra não infectada, baixo parasitismo, tratamento com antifúngico não relatado pelo paciente, bem como pouca experiência do profissional que faz a coleta (Youssef et al., 2018). A qualidade da amostra influencia diretamente no resultado do exame e alguns cuidados devem ser tomados no momento da coleta, como por exemplo, a assepsia adequada com álcool 70% no local a ser coletado e, além disso, conhecer as diferentes formas de coleta que são indicadas dependendo do tipo de lesão que o paciente apresenta.

Podemos observar com esses relatos que não há um censo comum em relação a sensibilidade dos exames, já que pode haver uma divergência nos resultados devido a uma série de fatores. Entretanto, para que essa questão seja superada, é importante que a cultura sempre seja associada ao EMD, para obtenção de um resultado mais fidedigno e, além disso, para que o fungo seja identificado, já que o tratamento pode ser diferente dependendo do microrganismo isolado. O EMD possui a vantagem de fornecer um resultado rápido para o clínico, orientando-o em relação a estrutura do fungo visualizada na microscopia, em hifas no caso de fungos filamentosos ou pseudo-hifas e

blastoconídios em casos de fungos leveduriformes. Em relação aos fungos prevalentes nas amostras de unha e pele, observamos em nosso estudo que na unha o fungo prevalente foi o *T. mentagrophytes*, seguido por *Candida* spp. e *T. rubrum*. Na pele observamos a prevalência de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, que estão em conformidade com os relatos da literatura (Havlickova, Czaika & Friedrich, 2008; Youssef et al., 2018).

Nossos resultados preliminares obtidos pelo ensaio *ex vivo* de infecção fúngica em pele suína revelaram que é possível induzir um processo infeccioso superficial, bem como avaliar a ação de agentes antifúngicos tópicos. A pele suína vem sendo amplamente utilizada como modelo para a pele humana, especialmente em função das questões éticas envolvidas com a utilização de pele humana, bem como pela similaridade da pele humana com a suína, tornando-a um substituto atrativo (Heard, 2020). Muitos artigos apoiam o uso da pele suína na pesquisa, que foi comparada de forma favorável em termos de permeabilidade (Godin & Touitou, 2007; Barbero & Frasch, 2008), arquitetura (Kong & Bhargava, 2011), biologia (Meyer, 1996) e imunologia (Summerfield, Meurens & Ricklin, 2014).

Entre as diversas regiões da pele suína, a porção dorsal da orelha é considerada a de maior similaridade com a pele humana (Heard, 2020). Turner, Pezzone & Badylak (2014) ressaltaram que variações histológicas regionais são observadas na pele suína, sugerindo que a localização anatômica deve ser avaliada antes de utilizar essa como substituta da pele humana. Estes mesmos autores relataram que a espessura média da camada queratinizada da pele suína é semelhante à humana, sendo uma característica importante ao promover um quadro infeccioso causado por fungos dermatófitos. Diferenças relacionadas à morfologia e composição entre a pele humana e suína são evidentes, dependendo da região do corpo. Mesmo assim, modelos utilizando a pele suína são os mais adequados substitutos da pele humana (Turner, Pezzone & Badylak, 2014).

Antes de avaliar o crescimento fúngico na pele suína, utilizamos álcool 70% para desinfetar as seções de pele, no entanto, isso não impediu o crescimento da microbiota. Ho, Delgado-Charro & Bolhuis (2020), que também induziram um processo infeccioso por dermatófito em pele suína, avaliaram a

desinfecção superficial da pele com etanol 70%, que também não foi efetivo. Os mesmos autores passaram a utilizar gás cloro para esterilizar a pele, que foi efetivo sem danificar a pele. Uma limitação do nosso modelo é a dificuldade em manter a pele conservada em meio de cultura (RPMI, estreptomicina/penicilina (1%) e soro fetal bovino (1%)), que impossibilitou a avaliação do miconazol em creme (Vodol), bem como da solução contendo o composto 4a por um período maior de tempo, que possivelmente resultaria em uma redução mais expressiva do crescimento fúngico, especialmente em relação ao composto 4a.

No estudo de Ho, Delgado-Charro & Bolhuis (2020), os autores não utilizaram meio líquido para conservar a pele, mas mantiveram os recortes de pele infectados com *T. rubrum* em contato com meio mínimo sólido. Os recortes de pele foram tratados por um período de sete dias com água (controle) e com antifúngicos em creme: clotrimazol 1% e terbinafina 1%. Uma forma de superar a dificuldade que encontramos em conservar a pele pode ser utilizando o meio mínimo mencionado.

É importante relatar que o nosso modelo de infecção em pele suína é isento de células do sistema imunológico. Esse fator resulta em um processo de invasão e crescimento fúngico mais abundante do que poderia ser observado *in vivo*, nesse sentido, infecções fúngicas crônicas não são bem modeladas com essa abordagem (Ho, Delgado-Charro & Bolhuis 2020). Mesmo assim, nossos resultados prévios indicam que o modelo poderá ser útil para avaliar novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções superficiais, em particular ao avaliar estágios iniciais de infecções fúngicas. Neste modelo, utilizamos o *T. mentagrophytes* como agente patogênico, fungo zoofílico, que pode causar dermatofitose em humanos e animais. São patógenos capazes de invadir tecidos queratinizados, como pele, unhas e cabelos (Miyajima et al., 2013). Estudos epidemiológicos evidenciam a distribuição global deste microrganismo, sendo um dos patógenos mais importantes envolvidos com infecções fúngicas na pele (Cai et al., 2014; Maraki & Mavromanolaki, 2016; Mitruka et al., 2016).

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados no presente estudo, concluímos que duas moléculas da classe dos 3-Selenocianatos-indólicos apresentaram atividade antifúngica de amplo espectro. Também foi possível padronizar um modelo *ex vivo* de onicomicose e avaliar de forma tópica a ação da molécula mais promissora. Ademais concluímos o seguinte:

- Após o *screening* de uma série de compostos da classe dos 3-Selenocianatos-indólicos, verificamos que dois compostos (4a e 4b) apresentam uma atividade antifúngica potente e de amplo espectro, contra *Candida* spp. e fungos dermatófitos. Essas moléculas foram selecionadas para darmos continuidade aos estudos.
- Os compostos selecionados não apresentaram um perfil citotóxico e nem mutagênico. No entanto, foi observado um dano no DNA pelo ensaio cometa. Pelo ensaio HET-CAM, observamos que as moléculas possuem um perfil não irritante.
- O mecanismo de ação dos compostos selecionados não foi completamente elucidado. Observamos que eles não possuem ação na membrana celular e nem na parede celular. O dano no DNA verificado pelo ensaio cometa, pode sugerir uma ação no DNA da célula fúngica.
- O composto 4a revelou um potencial fungicida contra *C. albicans* e *T. rubrum*. Sendo que para *C. albicans*, a atividade antifúngica é dependente da dose.
- O composto 4b revelou um potencial fungicida contra o *T. rubrum*, e um potencial fungistático contra a *C. albicans*. A atividade antifúngica contra o *T. rubrum* é dependente da dose.
- Foi possível padronizar um modelo *ex vivo* de onicomicose utilizando

casco suíno, como substituto da unha humana. Através desse modelo, estabelecemos um quadro infeccioso por *T. rubrum*, realizamos o tratamento e avaliamos uma provável recidiva. Esse modelo pode ser utilizado para a triagem de novos agentes antifúngicos tópicos.

- O composto 4a inserido em uma base comercial de esmalte, inibiu o processo infeccioso por *T. rubrum* no modelo de onicomicose. O crescimento fúngico remanescente visualizado na etapa de recidiva, sugere a necessidade de um período mais longo de tratamento.
- Os resultados preliminares do modelo *ex vivo* de infecção em pele suína, revelaram condições favoráveis para o estabelecimento de um quadro de dermatofitose, para a triagem de novos agentes antifúngicos tópicos.

8. REFERÊNCIAS

Akins RA. 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol.* 43:285-318.

Al-Rubaie AZ, Al-Jadaan SAS, Muslim SK, Saeed EA, Ali ET, Al-Hasani AKJ, Al-Salman HNK, Al-Fadal SAM. 2014. Synthesis, characterization and antibacterial activity of some new ferrocenyl selenazoles and 3,5-diferrocenyl-1,2,4-selenadiazole. *Journal of Organom Chem.* 774:43-47.

Al-Tamimi AS, Etxebeste-Mitxelorena M, Sanmartín C, Jiménez-Ruiz A, Syrjänen L, Parkkila S, Selleri S, Carta F, Angeli A, Supuran CT. 2019. Discovery of new organoselenium compounds as antileishmanial agents. *Bioorg Chem.* 86:339-345.

Alberdi E, Gómez C. 2019. Efficiency of methylene blue-mediated photodynamic therapy vs. intense pulsed light in the treatment of onychomycosis in the toenails. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 35(2):69-77.

Ali Malayeri F, Rezaei A, Raiesi O. 2018. Antifungal agents: polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. *J Basic Res Med Sci.* 5:48-55.

Alvarado-Flores J, Rico-Martínez R, Adabache-Ortíz A, Silva-Briano M. 2015. Morphological alterations in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766 (Rotifera: Monogononta) caused by vinclozolin chronic exposure. *Ecotoxicology.* 24(4):915-925.

Angelo T, Borgheti-Cardoso LN, Gelfuso GM, Taveira SF, Gratieri T. 2017. Chemical and physical strategies in onychomycosis topical treatment: A review. *Med Mycol.* 55(5):461-475.

Arendrup MC, Mavridou E, Mortensen KL, Snelders E, Frimodt-Moller N, Khan H, Melchers WJ, Verweij PE. 2010. Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLOS ONE.* 5:e10080.

Asha P. 2000. Oral Antifungal Agents Used In Dermatology. *Curr Probl Dermatol.* 12:270-275.

Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MC, Mourão FA, Massensini AR, Martins-Filho OA, Rocha-Vieira E, Brito-Melo GE. 2014. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res.* 47(4):307-315.

Azad GK, Balkrishna SJ, Sathish N, Kumar S, Tomar RS. 2012. Multifunctional Ebselen drug functions through the activation of DNA damage response and alterations in nuclear proteins. *Biochem Pharmacol.* 83:296-303.

Azambuja CVA, Pimmel LA, Klafke GB, Xavier MO. 2014. Onychomycosis:

clinical, mycological and *in vitro* susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. *An Bras Dermatol.* 89:581-586.

Baeyer A. 1866. Ueber die Reduction aromatischer Verbindungen mittelst Zinkstaub. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 140:295e296.

Baeyer A, Emmerling A. 1869. Synthese des indols. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* 2:679e682.

Balashov SV, Gardiner R, Park S, Perlin DS. 2005. Rapid, high-throughput, multiplex, real-time PCR for identification of mutations in the *cyp51A* gene of *Aspergillus fumigatus* that confer resistance to itraconazole. *J Clin Microbiol.* 43:214-22.

Bao Y, Wan Z, Li R. 2013. *In vitro* antifungal activity of micafungin and caspofungin against dermatophytes isolated from China. *Mycopathologia.* 175:141-145.

Baquedano Y, Alcolea V, Toro MÁ, Gutiérrez KJ, Nguewa P, Font M, Moreno E, Espuelas S, Jiménez-Ruiz A, Palop JA, Plano D, Sanmartín C. 2016. Novel heteroaryl selenocyanates and diselenides as potent antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(6):3802-3812.

Baran R. 2019. **Diseases of the Nails and their Management**, 5th edn. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.

Barbero AM, Frasch HF. 2008. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro.* 23:1-13.

Batista BG, et al. 2017. Allylic selenocyanates as new agents to combat *Fusarium* species involved with human infections. *ChemistrySelect.* 2(35):11926-11932.

Bhatta AK, Keyal U, Wang XL. 2016. Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review. *Photodiagn Photodyn Ther.* 15:228-235.

Baumbach CM, Michler JK, Nenoff P, Uhrlaß S, Schrödl W. 2020. Visualising virulence factors: *Trichophyton benhamiae* subtilisins demonstrated in a guinea pig skin *ex vivo* model. *Mycoses.* 63(9):970-978.

Bazana LCG, Carvalho AR, Silveira GP, de Oliveira LF, Teixeira ML, Lopes W, Vainstein MH, Barbosa FAR, Russo TVC, Sá MM, Canto RFS, Fuentefria AM. 2020. Allylic selenocyanates as antifungal agents against pathogenic *Candida* species. *ChemistrySelect.* 5:10495-10500.

Bazoni RF, Moura TA, Rocha MS. 2020. Hydroxychloroquine Exhibits a Strong Complex Interaction with DNA: Unraveling the Mechanism of Action. *J Phys Chem Lett.* 11(22):9528-9534.

Bédard P, Gauvin S, Ferland K, et al. 2020. Innovative human three-

dimensional tissue-engineered models as an alternative to animal testing. *Bioengineering (Basel)*. 7(3):115.

Beikert FC, Le MT, Koeninger A, Technau K, Clad A. 2011. Recurrent vulvovaginal candidosis: focus on the vulva. *Mycoses*. 54:807-810.

Belenky P, Camacho D, Collins JJ. 2013. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. *Cell Rep*. 3:350-358.

Bhatta AK, Huang X, Keyal U, Zhao JJ. 2014. Laser treatment for onychomycosis: a review. 57:734-740.

Blankenship JR, Wormley FL, Boyce MK, Schell WA, Filler SG, Perfect JR, et al. 2003. Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryot. Cell*. 2:422-430.

Bowman SM, Free SJ. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. 28:799-808.

Brasch J, Martins BS, Christophers E. 1991. Enzyme release by *Trichophyton rubrum* depends on nutritional conditions. *Mycoses*. 34:365-368.

Brasch J. 2010. Pathogenesis of tinea. *J Dtsch Dermatol Ges*. 8:780-786.

Bromley M, Johns A, Davies E, Fraczek M, Gilsenan JM, Kurbatova N, Keays M, Kapushesky M, Gut M, Gut I, Denning DW, Bowyer P. 2016. Mitochondrial complex I is a global regulator of secondary metabolism, virulence and azole sensitivity in fungi. *PLOS ONE*. 11:1-22.

Brown M, Turner R, Wevrett SR. 2018. Use of *in vitro* performance models in the assessment of drug delivery across the human nail for nail disorders. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 15(10):983-989.

Butts A, Koselny K, Chabrier-Roselló Y, Semighini CP, Brown JC, Wang X, Annadurai S, DiDone L, Tabroff J, Childers WE Jr, Abou-Gharbia M, Wellington M, Cardenas ME, Madhani HD, Heitman J, Krysan DJ. 2014. Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole *in vivo*. *mBio*. 5(1):e00765-13.

Cai W, Lu C, Li X, Zhang J, Zhan P, Xi L, Sun J, Yu X. 2016. Epidemiology of superficial fungal infections in Guangdong, Southern China: a retrospective study from 2004 to 2014. *Mycopath*. 181:387-395.

Calderone RA, Clancy CJ. 2012. ***Candida and Candidiasis***. ASM Press, USA.

Camps SM, Dutilh BE, Arendrup MC, Rijs AJ, Snelders E, Huynen MA, Verweij PE, Melchers WJ. 2012. Discovery of a *hapE* mutation that causes azole resistance in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing. *PLOS ONE*. 7:e50034.

Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. 2009. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:291-321.

Chadha N, Silakari O. 2017. Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view. *Europ Journal of Med Chem.* 134:159-184.

Chasteen TG, Bentley R. 2003. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem Rev.* 103(1):1-25.

CDC. 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States. CDC, Atlanta, GA.

Chandra SS, Miglani R, Srinivasan MR, Indira R. 2010. Antifungal efficacy of 5.25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gluconate, and 17% EDTA with and without an antifungal agent. *J Endod.* 36(4):675-678.

Chao MN, Lorenzo-Ocampo MV, Szajnman SH, Docampo R, Rodriguez JB. 2019. Further insights of selenium-containing analogues of WC-9 against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem.* 27(7):1350-1361.

Chaurasiya KR, Paramanathan T, McCauley MJ, Williams MC. 2010. Biophysical characterization of DNA binding from single molecule force measurements. *Phys. Life Rev.* 7:299-341.

Chen T, Wong YS, Zheng W, Liu J. 2009. Caspase and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by a synthetic selenadiazole derivative. *Chem. Biol. Interact.* 180:54-60.

Cherdtrakulkiat R, Boonpangrak S, Sinthupoom N, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2016. Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochem Bioph Reports.* 6:135-141.

Ciulla MG, Kumar K. 2018. The natural and synthetic indole weaponry against bacteria. *Tetrahedron Lett.* 59:3223-3233.

Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pinteia-Simon IA, Man A. 2020. *Candida* and candidiasis-opportunism versus pathogenicity: a review of the virulence traits. *Microorganisms.* 8(6):857.

Clark JM. 2018. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *Br J Nutr.* 120:S1-S7.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline. CLSI document M26-A. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, 1999.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard, CLSI, Wayne, PA, USA, 3rd edn, 2008, Document M27-A3.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard, CLSI, Wayne, PA, USA, 2nd edn, 2008, Document M38-A2.

Coatti GC, Marcarini JC, Sartori D, Fidelis QC, Ferreira DT, Mantovani MS. 2015. Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic) extracted from *Aspidosperma polyneuron* in HepG2 cells. *Cytotechnology*. 68(4):1161-1170

Coleman JJ, Mylonakis E. 2009. Efflux in fungi: La pièce de résistance. *Plos Pathog*. 5:e1000486.

Corzo-León DE, Munro CA, MacCallum DM. 2019. An *ex vivo* human skin model to study superficial fungal infections. *Front Microbiol*. 10:1172.

Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. 2014. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 5:a019752-a019752.

Crowley PD, Gallagher HC. 2014. Clotrimazole as a drug: past, present and future. *J. Appl. Microbiol*. 117:611-617.

Dabas Y, Xess I, Singh G, et al. 2017. Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of clinical dermatophytes following CLSI and EUCAST guidelines *J. Fungi (Basel)*. 3:E17.

Dahms HU, Hagiwara A, Lee JS. 2011. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquatic Toxicology*. 101:1-12.

Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruère C, Bonnin A, Hube B. 2010. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell. Microbiol*. 12:248-271.

Danso MO, Berkers T, Mieremet A, Hausil F, Bouwstra JK. 2015. An *ex vivo* human skin model for studying skin barrier repair. *Exp. Dermatol*. 24:48-54.

Denning DW. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*. 362:1142-1151.

Dhingra S, Cramer RA. 2017. Regulation of sterol biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development. *Front Microbiol*. 8:92.

Dias LB, Melhem MSC, Szeszs MW, Filho JM, Hahn RC. 2011. Vulvovaginal candidiasis in Mato Grosso, Brazil: pregnancy status, causative species and drug tests. *Braz J Microbiol*. 42:1300-1307.

Dixit RB, Vanparia SF, Patel TS, Jagani CL, Doshi HV, Dixit BC. 2010. Synthesis and antimicrobial activities of sulfonohydrazide-substituted 8-hydroxyquinoline derivative and its oxinates. *Appl Organometal Chem.* 24:408-413.

Dogra S, Narang T. 2017. Emerging atypical and unusual presentations of dermatophytosis in India. *Clin Dermatol Rev.* 1:12-18.

de Hoog GS, Dukik K, Monod M, et al. 2017. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia.* 182:5-31.

Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. 2004. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J Infect.* 48(2):175-80.

El-Awady R, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A, Elrasheed A, Elakraa G. 2016. The role of eukaryotic and prokaryotic ABC transporter family in failure of chemotherapy. *Front Pharmacol.* 7:535.

Elewski BE. 1998. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev.* 11:415-429.

Elewski BE, Rich P, Tosti A, Pariser DM, Scher R, Daniel RC, Gupta AK. 2013. Onychomycosis: an overview. *J Drugs Dermatol.* 12:96-103.

Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S. 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod.* 71(10):1720-1725.

Etxebeste-Mitxeltoarena M, Plano D, Espuelas S, Moreno E, Aydillo C, Jiménez-Ruiz A, García Soriano JC, Sanmartín C. 2020. New amides containing selenium as potent leishmanicidal agents targeting trypanothione reductase. *Antimicrob Agents Chemother.* 12:AAC.00524-20.

Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, Hurst R. 2011. Selenium in human health and disease. *Antioxidante. Redox Signal.* 14:1337-1383.

Fatma F, Verma S, Kamal A, Srivastava A. 2018. Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. *Chemosph.* 195:864-870.

Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455:81-95.

Ferreira G. F., Baltazar L. E. M., Santos J. R., Monteiro A. S., Fraga L. A., Resende-Stoianoff M. A., et al. 2013. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:1801-1811.

Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF, Alves SH, Rolim CM, Beck RC, da Silva CB. 2013. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil

on the growth of *Trichophyton rubrum*. Mycopath. 175(3-4):281-286.

Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhauser J. 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. Antimicrob Agents Chemother. 42:3065-3072.

Frías-De-León MG, Martínez-Herrera E, Atoche-Diéguez CE, Cespón JLG, Uribe B, Arenas R, Rodríguez-Cerdeira C. 2020. Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. Int J Med Sci. 17(1):45-52.

Friedman DZP, Schwartz IS. 2019. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. J. Fungi. 5:67.

Fuentefria AM, Lana DFD, Scarton J, de Oliveira OLM, Pagnussat V. 2019. **Atlas de micología médica**. Porto Alegre. 104p.

Garcia-Effron G, Lee S, Park S, et al. 2009. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. Antimicrob Agents Chemother. 53:3690-3699.

Gershon H, Gershon M, Clarke DD. 2001. Antifungal activity of substituted 8-quinolinol-5- and 7-sulfonic acids: A mechanism of action is suggested based on intramolecular synergism. Mycopath. 155:213-217.

Ghannoum M, Isham N, Verma A, Plaum S, Fleischer A Jr, Hardas B. 2013. *In vitro* antifungal activity of naftifine hydrochloride against dermatophytes. Antimicrob Agents Chemother. 57(9):4369-4372.

Ghannoum M, Sevin K, Sarkany M. 2016. Amorolfine 5% nail lacquer exhibits potent antifungal activity compared to three acid-based devices indicated for the treatment of onychomycosis: an *in vitro* nail penetration assay. Dermatol Ther. 6:69-75.

Gillam EMJ, Notley LM, Cai H, De Voss JJ, Guengerich FP. 2000. Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. Biochemistry. 39(45):13817-13824.

Gnat S, Łagowski D, Nowakiewicz A, Ziezba P. 2018. Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. J Appl Microbiol. 125:700-709.

Gnat S, Nowakiewicz A, Ziezba, P. 2019. Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. Adv Microbiol 58:49-58.

Godin B, Touitou E. 2007. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. Adv Drug Deliv Rev. 59:1152-1161.

Gow NAR, Brown AJP, Odds FC. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:366-371.

Grover C, Khurana A. 2012. Onychomycosis: newer insights in pathogenesis and diagnosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 78(3):263-270.

Grover C, Khurana A. 2014. Onychomycosis: Newer insights in pathogenesis and diagnosis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 78(3):263-270.

Grover C, Jakhar D, Sharma S. 2020. The grid pattern of white superficial onychomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 86(5):568-570.

Guinea J. 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect.* 20:5-10.

Guilloteau K, Paris I, Pedretti N, Boniface K, Juchaux F, Huguier V, et al. 2010. Skin inflammation induced by the synergistic action of IL-17A, IL-22, oncostatin M, IL-1, and TNF-recapitulates some features of psoriasis. *J. Immunol.* 184:5263-5270.

Gupta AK, Sauder DN, Shear NH. 1994. Antifungal agents: an overview. Part II. *J Am Acad Dermatol.* 30:911-933.

Gupta A, Lynde CW, Jain HC et al. 1997. A higher prevalence of onychomycosis in psoriatics compared with non-psoriatics: a multicentre study. *Br J Dermatol* 136:786-789.

Gupta AK, Mays RR, Versteeg SG, Shear NH, Piguet V. 2018. Update on current approaches to diagnosis and treatment of onychomycosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 16(12):929-938.

Gupta AK, Mays RR, Versteeg SG, Piraccini BM, Takwale A, Shemer A, Babaev M, Grover C, Di Chiacchio NG, Taborda PRO, Taborda VBA, Shear NH, Piguet V, Tosti A. 2019. Global perspectives for the management of onychomycosis. *Int J Dermatol.* 58(10):1118-1129.

Gupta AK, Cooper EA. 2008. Update in antifungal therapy of dermatohyphosis. *Mycopathologia.* 166:353-367.

Gupta AK, Uro M, Cooper EA. 2010. Onychomycosis therapy: past, present, future. *J Drugs Dermatol.* 9:1109-1113.

Gupta AK, Stec N. 2019. Recent advances in therapies for onychomycosis and its management. *F1000Res.* 8:F1000.

Gupta AK, Stec N, Summerbell RC, Shear NH, Piguet V, Tosti A, Piraccini BM. 2020. Onychomycosis: a review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 34(9):1972-1990.

Hammer TR, Mucha H, Hofer D. 2011. Infection risk by dermatophytes during storage and after domestic laundry and their temperature-dependent inactivation. *Mycopathologia*.171:43-49.

Hampe IAI, Friedman J, Edgerton M, Morschhäuser J. 2017. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. *Plos Pathog*. 13:e1006655.

Haritha C, Sharun K, Jose B. 2020. Ebselen, a new candidate therapeutic against SARS-CoV-2. *Int J Surg (Lond Engl)*. 84:53.

Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL, Noverr MC. 2010 *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microb*. 156:3635-3644

Havlickova B, Czaika V, Friedrich M. 2009. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 51:2-15.

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 4:2-15.

Heard CM. 2020. An *ex vivo* skin model to probe modulation of local cutaneous arachidonic acid inflammation pathway. *J Biol Methods*. 4:e138.

Ho FK, Delgado-Charro MB, Bolhuis A. 2020. Evaluation of an explanted porcine skin model to investigate infection with the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Mycopath*. 185(2):233-243.

Höfs S, Mogavero S, Hube B. 2016. Interaction of *Candida albicans* with host cells: Virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J. Microbiol*. 54:149-169.

Hokken MWJ, Zwaan BJ, Melchers WJG, Verweij PE. 2019. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal Genet Biol*. 132:103254.

Hopkins FG, Cole SW. 1901. A contribution to the chemistry of proteids: Part I. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion. *J. Physiol*. 27:418.

Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I. 2004. Anti-staphylococcal activity of indolmycin, a potential topical agent for control of staphylococcal infections. *J. Antimicrob. Chemother*. 54:549e552.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, The Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Research Triangle Park: National Toxicology Program, ICCVMA, 2010.

Jacob TR, Peres NT, Martins MP, Lang EA, Sanches PR, Rossi A, et al. 2015. Heat shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for the development of novel drugs against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Front*

Microbiol. 6:1241.

Jia Y, Wen X, Gong Y, Wang X. 2020. Current scenario of indole derivatives with potential anti-drug-resistant cancer activity. *Eur J Med Chem.* 200:e112359.

Joaquim AR, Pippi B, de Cesare MA, et al. 2019. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chem Biol & Drug Design.* 00:1-11.

Joshi SM, De Britto S, Jogaiah S, Ito SI. 2019. Mycogenic Selenium Nanoparticles as Potential New Generation Broad Spectrum Antifungal Molecules. *Biomolecules.* 9(9):419.

Juvvadi PR, Lee SC, Heitman J, Steinbach WJ. 2016. Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence.* 8(2):186-197.

Kadri D, Crater AK, Lee H, Solomon VR, Ananvoranich S. 2014. The potential of quinoline derivatives for the treatment of *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Parasitol.* 145:135-144.

Kanamaru T, Nakano Y, Toyoda Y, Miyagawa KI, Tada M, Kaisho T, Nakao M. 2001. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of TAK-083, an agent for treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:2455e2459.

Kassem EM, El-Sawy ER, Abd-Alla HI, Mandour AH, Abdel-Mogeed D, El-Safty MM. 2012. Synthesis, antimicrobial, and antiviral activities of some new 5-sulphonamido-8-hydroxyquinoline derivatives. *Arch Pharma Res.* 35:955-964.

Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, et al. 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem.* 20:5678-5698.

Katiyar SK, Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, Johnson ME, Perlin DS, Edlind TD. 2012. Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: Implications for echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:6304-6309.

Kaur H, Chakrabarti A. 2017. Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. *J Fungi.* 3(3):41.

Kaushik NK, Kaushik N, Attri P, Kumar N, Kim CH, Verma AK, Choi EH. 2013. Biomedical importance of indoles. *Molecules* 18:6620-6662.

Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. 2019. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet Biol.* 132:103255.

Kiliç Z, Işgör YG, Olgen S. 2009. Evaluation of new indole and bromoindole derivatives as pp60(c-Src) tyrosine kinase inhibitors. *Chem Biol Drug Des.* 74(4):397-404.

Kim J, Tsuchihashi H, Hiruma M, Kano R, Ikeda S. 2018. Tinea corporis due to *Trichophyton erinacei* probably transmitted from a hedgehog. *Med Mycol J.* 59(4):E77-E79.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(5):1207-1212.

Ko JY, Lee HE, Jae H, Oh DH, Kim JS, Yu HJ. 2011. Cure rate, duration required for complete cure and recurrence rate of onychomycosis according to clinical factors in Korean patients. *Mycoses.* 54:e384-e388.

Kobayashi H, Suzuki N, Ogra Y. 2018. Mutagenicity comparison of nine bioselenocompounds in three *Salmonella typhimurium* strains. *Toxicol Rep.* 5:220-223.

Köhler HR, Triebkorn R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticide: can we track effects to the population level and beyond? *Science.* 341:759-765.

Köhler JR, Hube B, Puccia R, Casadevall A, Perfect JR. 2017. **Fungi that infect humans.** In Heitman J, Howlett B, Crous P, Stukenbrock E, James T, Gow N (ed), *The Fungal Kingdom.* ASM Press, Washington, DC. p 813-843.

Kong R, Bhargava R. 2011. Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging. *Analyst.* 136:2359-2366.

Kostopoulou V, Carmona MJ, Divanach P. 2012. The rotifer *Brachionus plicatilis*: an emerging bio-tool for numerous applications. *Journal of Biological Research-Thessaloniki.* 17:97-112.

Krenn L, Paper DH. 2009. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine.* 16:1083-1088.

Kumar S, Sharma N, Maurya IK, Verma A, Kumar S, Bashin KK, Sharma RK. 2017. Insights into selenylation of imidazo[1,2-a]pyridine: synthesis, structural and antimicrobial evaluation. *New J. Chem.* 41:2919-2926.

Kumar A, Zarychanski R, Pisipati A, Kumar A, Kethireddy S, Bow EJ. 2018. Fungicidal versus fungistatic therapy of invasive *Candida* infection in non-neutropenic adults: a meta-analysis. *Mycology.* 9(2):116-128.

Kumari A, Singh RK. 2019. Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic prospectives. *Bioorg Chem.* 89:103021.

Labib GS, Aldawsari H. 2015. Innovation of natural essential oil-loaded Orabase

for local treatment of oral candidiasis. *Drug Des Devel Ther.* 9:3349-3359.

Lakshmipathy DT, Kannabiran K. 2010. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. *Natural Sci.* 2:726-731.

Łączkowski KZ, Motylewska K, Baranowska-Łączkowska A, Biernasiuk A, Misiura K, Malm A, Fernández B. 2016. Synthesis, antimicrobial evaluation and theoretical prediction of NMR chemical shifts of thiazole and selenazole derivatives with high antifungal activity against *Candida* spp. *Journal of Molec Struct.* 1108:427-437.

Lebouvier N, Pagniez F, Na YM, Shi D, Pinson P, Marchivie M, Guillon J, Hakki T, Bernhardt R, Yee SW, Simons C, Lézé MP, Hartmann RW, Mularoni A, Le Baut G, Krimm I, Abagyan R, Le Pape P, Le Borgne M. 2020. Synthesis, Optimization, Antifungal Activity, Selectivity, and CYP51 Binding of New 2-Aryl-3-azoyl-1-indolyl-propan-2-ols. *Pharmaceuticals (Basel).* 13(8):186.

Lee REB, Liu TT, Barker KS, Lee RE, Rogers PD. 2005. Genome-wide expression profiling of the response to ciclopirox olamine in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 55:655-662.

Leung AKC, Lam JM, Leong KF, et al. 2020. Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 14(1):32-45.

Li JY, Sun XF, Li JJ, Yu F, Zhang YXJ, Huang XJ, Jiang FX. 2020. The antimalarial activity of indole alkaloids and hybrids. *Arch Pharm.* 353(11):E2000131.

Li L, Jin Y, Wang B, Yang Z, Liu M, Guo H, Zang J, Lu, Y. 2017. A structure-based strategy toward the development of novel candidates for antimycobacterial activity: Synthesis, biological evaluation, and docking study. *Chem Bio Dr Des.* 91:769-780.

Lipner SR, Scher RK. 2014. Onychomycosis: current and investigational therapies. *Cutis.* 94:E21-E24.

Lipner SR, Scher RK. 2015. **Onychomycosis: diagnosis and therapy.** In Razzaghi-Abyaneh M, M Shams-Ghahfarokhi M, Rai, eds. *Medical Mycology: Current Trends and Future Prospects.* CRC Press, Boca Raton, FL; p.28-57.

Lipner SR. 2019. Pharmacotherapy for onychomycosis: new and emerging treatments. *Expert Opin Pharmacother.* 6:725-735.

Lipner SR, Scher RK. 2019. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. *J Am Acad Dermatol.* 80(4):835-851.

Liu Y, Cui Y, Lu L, Gong Y, Han W, Piao G. 2020. Natural indole-containing alkaloids and their antibacterial activities. *Arch Pharm.* 353(10):e2000120.

Lopes AI, Tavaría FK, Pintado ME. 2020. Conventional and natural compounds for the treatment of dermatophytosis. *Med Mycol.* 58(6):707-720.

Loreto ES, Mario DA, Santurio JM, Alves SH, Nogueira CW, Zeni G. 2011. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. *Mycoses.* 54(5):e572-6.

Luchini A, Delhom R, Cristiglio V, Knecht W, Wacklin-Knecht H, Fragneto G. 2020. Effect of ergosterol on the interlamellar spacing of deuterated yeast phospholipid multilayers. *Chem Phys Lipids.* 227:104873.

Lusiana RS, Muller-Goymann CC. 2013. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum in vitro*. *Eur J Pharm Biopharm.* 84:599-605.

Luthra T, Nayak AK, Bose S, Chakrabarti S, Gupta A, Sen S. 2019. Indole based antimalarial compounds targeting the melatonin pathway: their design, synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem.* 168:11-27.

Ma W, Si C, Kasyanju Carrero LM, et al. 2019. Laser treatment for onychomycosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 98(48):e17948.

Mao X, Schimmer AD. 2008. The toxicology of clioquinol. *Tox Lett.* 182:1-6.

Maraki S, Mavromanolaki VE. 2016. Epidemiology of dermatophytoses in Crete, Greece. *Med. Mycol. J.* 57:E69-E75.

Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FCS, Odds FC, Vanden Bossche H. 1999. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology.* 145:2701-2713.

Martinez-Rossi NM, Bitencourt TA, Peres NTA, Lang EAS, Gomes EV, Quaresimin NR, Martins MP, Lopes L, et al. 2018. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. *Front Microbiol.* 9:1108.

Meng T, Hou Y, Shang C, Zhang J, Zhang B. 2020. Recent advances in indole dimers and hybrids with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archiv Der Pharmazie.* 28:e2000266.

Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, et al. 2014. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:6627-6638.

Meyer W. 1996. Comments on the suitability of swine skin as a biological model for human skin. *Hautarzt.* 47:178-182.

Miceli MH, Kauffman CA. 2015. Isavuconazole: a new broadspectrum triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis.* 61:1558-1565.

Mitruka B, Gill AK, Kaur N, Mittal RK, Mahajan A, Kaur A. 2016. Mycological analysis of 150 cases of dermatophytosis of skin, hair and nail attending the outpatient department of skin and venereology. *Ann. Appl. Bio Sci.* 3:A170-A182.

Miyajima Y, Satoh K, Uchida T, Yamada T, Abe M, Watanabe S, Makimura M, Makimura K. 2013. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J. Dermatol. Sci.* 69:229-235.

Monod M, Feuermann M, Salamin K, Fratti M, Makino M, Alshahni MM, Makimura K, Yamada T. 2019. *Trichophyton rubrum* azole resistance mediated by a new ABC transporter, TruMDR3. *Antimicrob Agents Chemother* 63(11):e00863-19.

Moraes RC, Lana AJD, Kaiser S, Carvalho AR, de Oliveira LFS, Fuentefria AM, Ortega GG. 2015. Antifungal activity of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. against resistant non-*albicans* *Candida* isolates. *Ind Crop Prod.* 69:7-14.

Morgado LF, Trávolo ARF, Muehlmann LA, Narcizo PS, Nunes RB, Pereira PAG, et al. 2017. Photodynamic therapy treatment of onychomycosis with aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions: A proof of concept clinical trial. *J Photochem Photobiol B.* 173:266-270.

Moriarty B, Hay R, Morris-Jones R. 2012. The diagnosis and management of tinea. *BMJ.* 345:e4380-e4380.

Mugesh G, du Mont WW, Sies H. 2001. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev.* 101(7):2125-2179.

Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, Abbes S, Cheikhrouhou F, Sellami H, et al. 2017. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *J Biomed Sci.* 24:67.

Nenoff P, Kruger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. 2014. Mycology, an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 12:188-209.

Ngo HX, Garneau-Tsodikova S, Green KD. 2016. A complex game of hide and seek: the search for new antifungals. *Medchemcomm.* 7:1285-1306.

Nie Y, Zhong M, Li S, Li X, Zhang Y, Zhang Y, He X. 2020. Synthesis and potential anticancer activity of some novel selenocyanates and diselenides. *Chem Biodivers.* 17(5):e1900603.

- Nogueira CW, Barbosa NV, Rocha JBT. 2021. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. *Arch Toxicol.* 95(4):1179-1226.
- Nweze EI, Eke IE. 2017. Dermatophytes and dermatophytosis in the eastern and southern parts of Africa. *Med Mycol.* 56:13-28.
- Odds FC, Brown AJ, Gow NA. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11:272-279.
- Odom AR. 2014. The triphenyl ethylenes, a novel class of antifungals. *MBio.* 5: e1126-e1114.
- Ohnemus U, Willers C, Bubenheim M, et al. 2007. An *ex-vivo* oral mucosa infection model for the evaluation of the topical activity of antifungal agents. *Mycoses.* 51:21-29.
- Ölgen S, Kiliç-Kurt Z, Şener F, Işgör YG, Çoban T. 2011. Evaluation of novel aminomethyl indole derivatives as Src kinase inhibitors and antioxidant agents. *Chemotherapy.* 57(1):1-6.
- Oliveri V, Vecchio G. 2016. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: a structural perspective. *Europ Jour of Med Chem.* 120:252-274.
- Osborne CS, Leitner I, Favre B, Ryder NS. 2004. Antifungal drug response in an *in vitro* model of dermatophyte nail infection. *Med Mycol.* 42:159-163.
- Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. 2010. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 9:719-727.
- Öztürk AA, Yenilmez E, Şenel B, Kıyan HT, Güven UM. 2020. Effect of different molecular weight PLGA on flurbiprofen nanoparticles: formulation, characterization, cytotoxicity, and *in vivo* anti-inflammatory effect by using HET-CAM assay. *Drug Dev Ind Pharm.* 46(4):682-695.
- Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, Martiny D, Vandenberg O, Detandt M. 2013. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol.* 51(6):580-585.
- Pais P, Pires C, Costa C, Okamoto M, Chibana H, Teixeira MC. 2016. Membraneproteomics analysis of the *Candida glabrata* response to 5-flucytosine: Unveiling the role and regulation of the drug efflux transporters CgFlr1 and CgFlr2. *Front.Microbiol.* 7:1-14.
- Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu M-J, Register E, Li W, Vyas V, Fan H, Abruzzo G, et al. 2005. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3264-3273.

Patil A, Majumdar S. 2017. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *J Pharm Pharmacol.* 69:1635-1660.

Pereira MN, Reis TA, Matos BN, Cunha-Filho M, Gratieri T, Gelfuso GM. 2017. Novel *ex vivo* protocol using porcine vagina to assess drug permeation from mucoadhesive and colloidal pharmaceutical systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 158:222-228.

Peres NT, Silva LG, Santos Rda S, Jacob TR, Persinoti GF, Rocha LB, Falcão JP, Rossi A, Martinez-Rossi NM. 2016. *In vitro* and *ex vivo* infection models help assess the molecular aspects of the interaction of *Trichophyton rubrum* with the host milieu. *Med Mycol.* 54(4):420-427.

Perez DR, Sklar LA, Chigaev A. 2019. Clioquinol: To harm or heal. *Pharmacol Ther.* 199:155-163.

Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. 2017. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis.* 17: 383-392

Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36:1-53.

Pfaller MA. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 125:S3e13.

Pfaller MA, Casanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. 2012. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 4:1199e203.

Pinnock A, Shivshetty N, Roy S, et al. 2017. *Ex vivo* rabbit and human corneas as models for bacterial and fungal keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 255(2):333-342.

Pippi B, Reginatto P, Machado GDRM, Bergamo VZ, Lana DFD, Teixeira ML, Franco LL, Alves RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. 2017. Evaluation of 8-hydroxyquinoline derivatives as hits for antifungal drug design. *Med Mycol.* 55:763-773.

Piraccini BM, Alessandrini A. 2015. Onychomycosis: A Review. *J Fungi (Basel).*1(1):30-43.

Pires CA, Cruz NF, Lobato AM, Sousa PO, Carneiro FR, Mendes AM. 2014. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *An Bras Dermatol.* 89(2):259-264.

Poerschke RL, Moos PJ. 2011. Thioredoxin reductase 1 knockdown enhances selenazolidine cytotoxicity in human lung cancer cells via mitochondrial dysfunction. *Biochem Pharmacol.* 81:211-221.

Popeil D, Dawidziuk A, Koczyk G, Mackowiak A, Marcinkowska K. 2017. Multiple facets of response to fungicides - the influence of azole treatment on expression of key mycotoxin biosynthetic genes and candidate resistance factors in the control of resistant *Fusarium* strains. Euro Jour of Plant Pathol. 147:773-785.

Poyntner C, Blasi B, Arcalis E, Mirastschijski U, Sterflinger K, Tafer H. 2016. The transcriptome of *Exophiala dermatitidis* during ex-vivo skin model infection. Front Cell Infect Microbiol. 6:136.

Putman M, van Veen HW, Konings WN. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev. 64:672-693.

Rafat Z, Hashemi SJ, Saboor-Yaraghi A-A et al. 2019. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology, casual agents and demographic characteristics of onychomycosis in Iran. J Mycol Medicales. 29:265-272.

Raghavendra KR, Yadav D, Kumar A, Sharma M, Bhuria J, Chand AE. 2015. The nondermatophyte molds: emerging as leading cause of onychomycosis in south-east Rajasthan. Indian Dermatol Online J. 6:92-97.

Rajagopalan M, Inamadar A, Mittal A, Miskeen AK, Srinivas CR, Sardana K, Godse K, Patel K, et al. 2018. Expert consensus on the management of dermatophytosis in India (ECTODERM India). BMC Dermatol. 18(1):6.

Ranawaka RR, Nagahawatte A, Gunasekara TA, Weerakoon HS, de Silva SHP. 2016. Randomized, double-blind, comparative study on efficacy and safety of itraconazole pulse therapy and terbinafine pulse therapy on nondermatophyte mold onychomycosis: a study with 90 patients. J Dermatol Treat. 27:364-372.

Rashidian S, Falahati M, Kordbacheh P, Mahmoudi M, Safara M, Sadeghi Tafti H, Mahmoudi S, Zaini F. 2015. A study on etiologic agents and clinical manifestations of dermatophytosis in Yazd, Iran. Curr Med Mycol. 1:20-25.

Rebechi D, Richardi VS, Vicentini M, Guiloski IC, Assis HC, Navarro-Silva MA. 2014. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. Rev Bras Entomol. 58(3):296-301.

Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. 2018. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. Curr Opin Microbiol. 45:70-76.

Rivas L, Mühlhauser M. 2015. Complejo *Trichophyton mentagrophytes* [*Trichophyton mentagrophytes* complex]. Rev Chilena Infectol. 32(3):319-320.

Robbins N, Wright GD, Cowen LE. 2016. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. Microbiol Spectrum 4(5): PMID: 27763259.

Rocha EMF, Gardiner RE, Park S, Martinez-Rossi NM, Perlin DS. 2006. APhe389Leu substitution in ErgA confers terbinafine resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:2533-2536.

Rocha MS. 2015. Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate DNA interactions with drugs and proteins in single molecule experiments. *Integr Biol.* 7:967-986.

Rodrigues CF, Rodrigues ME, Silva S, Henriques M. 2017. *Candida glabrata* biofilms: how far have we come? *J Fungi.* 3:11.

Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, Shaw D, Mushtaq K, Paul RA, Narang T, Chakrabarti A. 2018. Mutation in the squalene epoxidase gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* associated with allylamine resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(5):e02522-17.

Sahoo AK, Mahajan R. 2016. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatol Online J.* 7:77-86.

Sakhuja R, Panda SS, Khanna L, Khurana S, Jain SC. 2011. Design and synthesis of spiro [indole-thiazolidine] spiro [indole-pyrans] as antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 21:5465e5469.

Saner MV, Kulkarni AD, Pardeshi CV. 2014. Insights into drug delivery across the nail plate barrier. *J Drug Target.* 22(9):769-789.

Sanglard D, Ischer F, Bille J. 2001. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1174-1183.

Sanglard D, Coste A, Ferrari S. 2009. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* 9:1029-1050.

Sardana K, Arora P, Mahajan K. 2017. Intracutaneous pharmacokinetics of oral antifungals and their relevance in recalcitrant cutaneous dermatophytosis: Time to revisit basics. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 83:730-732.

Schaller M, Borelli C, Berger U, Walker B, Schmidt S, Weindl G, Jackel A. 2009. Susceptibility testing of amorolfine, bifonazole, and ciclopiroxolamine against *Trichophyton rubrum* in an *in vitro* model of dermatophyte nail infection. *Med Mycol.* 47:753-758.

Scher RK, Tavakkol A, Sigurgeirsson B, Hay RJ, Joseph WS, Tosti A, et al. . Onychomycosis: Diagnosis and definition of cure. *J Am Acad Dermatol.* 56(6): 939-44.

Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, Ryan L, Shackleton J, Trimlett R, Meis JF, et al. 2016. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist*

Infect Control. 5:35.

Schmid W. 1975. The Micronucleus Test. *Mut. Res.* 31:9-15.

Scorzoni L, de Paula E Silva AC, Marcos CM, Assato PA, de Melo WC, de Oliveira HC, Costa-Orlandi CB, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. 2017. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front Microbiol.* 8:36.

Selmecki A, Forche A, Berman J. 2006. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science.* 313:367-370.

Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. 2011. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75:213-267

Sharma N, Sharma D. 2015. An upcoming drug for onychomycosis: tavaborole. *J Pharmacol Pharmacother.* 6:236-239.

Sharpley AL, Williams C, Holder AA, Godlewska BR, Singh N, Shanyinde M, MacDonald O, Cowen PJ. 2020. A phase 2a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, add-on clinical trial of ebselen (SPI-1005) as a novel treatment for mania or hypomania. *Psychopharmacol (Berl).* (12):3773-3782.

Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev.* 12:40-79.

Shin SH, Lee YS, Shin YP, et al. 2013. Therapeutic efficacy of halocidin-derived peptide HG1 in a mouse model of *Candida albicans* oral infection. *J Antimicrob Chemother.* 68:1152-1160.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 36:288-305.

Singh P, Verma P, Yadav B, Komath SS. 2011. Synthesis and evaluation of indolebased new scaffolds for antimicrobial activities identification of promising candidates. *Bioorg Med Chem Lett.* 21:3367e3372.

Singh A, Masih A, Khurana A, Singh PK, Gupta M, Hagen F, Meis JF, Chowdhary A. 2018. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses.* 61(7):477-484.

Slaven JW, Anderson MJ, Sanglard D, Dixon GK, Bille J, Roberts IS, Denning DW. 2002. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol.* 36:199-206.

- Sobel JD. 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 369(9577):1961-1971.
- Souza PR, Vettorato G, Pinto GM, Duquia RP, Amaro TG, Almeida Junior HL, Breunig JA. 2012. Concordance between direct microscopy and fungal culture for the diagnostic of feet's onychomycosis. *An Bras Dermatol*. 87:157-159.
- Spampinato C, Leonardi D. 2013. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Res Int*. 2013: 204237.
- Spengler G, Gajdács M, Marć MA, Domínguez-Álvarez E, Sanmartín C. 2019. Organoselenium compounds as novel adjuvants of chemotherapy drugs-a promising approach to fight cancer drug resistance. *Molecules*. 24(2):336.
- Spengler G, Kincses A, Mosolygó T, Marć MA, Nové M, Gajdács M, Sanmartín C, McNeil HE, Blair JMA, Domínguez-Álvarez E. 2019. Antiviral, antimicrobial and antibiofilm activity of selenoesters and selenoanhydrides. *Molecules*. 24(23):4264.
- Steinbach WJ, Cramer RA Jr, Perfect BZ, Asfaw YG, Sauer TC, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Benjamin DK Jr, Heitman J, Perfect JR. 2006. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 5(7):1091-103.
- Suenkel B, Fischer F, Steegborn C. 2013. Inhibition of the human deacylase Sirtuin 5 by the indole GW5074. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 23(1):143-146.
- Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. 2014. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol*. 66:14-21.
- Sydnor ERM, Perl TM. 2011. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microb Rev*. 24(1):141-173.
- Symoens F, Jousson O, Planard C, Fratti M, Staib P, Mignon B, Monod M. 2011. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int J Med Microbiol*. 301(3):260-266.
- Tainwala R, Sharma Y. 2011. Pathogenesis of dermatophytoses. *Indian J Dermatol*. 56:259-261.
- Tang SX, Moyes DL, Richardson JP, Blagojevic M, Naglik JR. 2016. Epithelial discrimination of commensal and pathogenic *Candida albicans*. *Oral Dis*. 22:114-119.
- Thangamani S, Younis W, Seleem MN. 2015. Repurposing ebselen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. *Sci Rep*. 5:11596.
- Thangamani S, Eldesouky HE, Mohammad H, Pascuzzi PE, Avramova L, Hazbun TR, Seleem MN. 2017. Ebselen exerts antifungal activity by regulating

glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) production in fungal cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 1861(1 Pt A):3002-3010.

Thanna S, Goins CM, Knudson SE, Slayden RA, Ronning DR, Sucheck SJ. 2017. Thermal and photoinduced copper-promoted C-Se bond formation: synthesis of 2-alkyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ones and evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Org Chem.* 82(7):3844-3854.

Thatai P, Sapra B. 2014. Transungual delivery: deliberations and creeds. *Int J Cosmet Sci.* 36:398-411.

Thatai P, Sapra B. 2018. Terbinafine hydrochloride nail lacquer for the management of onychomycosis: formulation, characterization and *in vitro* evaluation. *Ther Deliv.* 9(2):99-119.

The University of Adelaide. **Mycology Online.** 2016. Austrália. Disponível em: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>. Acesso em: 01 jun. 2021.

Tosti A, Baran R, Piraccini BM, Fanti PA. 1999. "Endonyx" onychomycosis: a new modality of nail invasion by dermatophytes. *Acta Derm Venereol.* 79(1):52-53.

Tosti A, Elewski BE. 2016. Onychomycosis: practical approaches to minimize relapse and recurrence. *Skin Appendage Disord.* 2(1-2):83-87.

Turner NJ, Pezzone D, Badylak SF. 2014. Regional variations in the histology of porcine skin. *Tissue Eng Part C Methods.* 21:373-384.

US Environmental Protection Agency. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA-600/4-85-013. Washington D.C.

Van Daele R, Spriet I, Wauters J, Maertens J, Mercier T, Van Hecke S, Brüggemann R. 2019. Antifungal drugs: What brings the future? *Med Mycol.* 57(Supplement_3):S328-S343.

Vanstone S, Stone JM, Gordeev SN, Guy RH. 2019. Mechanism of human nail poration by high-repetition-rate, femtosecond laser ablation. *Drug Deliv Transl Res.* 9(5):956-967.

Veasey JV, Nappi F, Zaitz C, Muramatu LH. 2017. Descriptive analysis of mycological examination of patients with onychomycosis treated in private practice. *An Bras Dermatol.* 92:134-136.

Venturini TP, Chassot F, Loreto ÉS, Keller JT, Azevedo MI, Zeni G, Santurio JM, Alves SH. 2016. Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Fusarium* spp. *Med Mycol.* 54(5):550-555.

Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. 2000. Flucytosine: a review of its

pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 46(2):171-179.

Vlahovic TC. 2016. Onychomycosis. *Clin Podiatr Med Surg.* 33:305-318.

Xu W, Jong Hong S, Jia S, Zhao Y, Galiano RD, Mustoe TH. 2012. Application of a partial-thickness human *ex vivo* skin culture model in cutaneous wound healing study. *Lab. Invest.* 92:584-599.

Zhanel GG, Saunders DG, Hoban DJ, Karlowsky JA. 2001. Influence of human serum on antifungal pharmacodynamics with *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:2018-2022.

Zhou BR, Lu Y, Permatasari F, Huang H, Li J, Liu J, Zhang JA, Luo D, Xu Y. 2016. The efficacy of fractional carbon dioxide (CO₂) laser combined with luliconazole 1% cream for the treatment of onychomycosis: A randomized, controlled trial. *Medicine (Baltimore).* 95(44):e5141.

Zuo R, Garrison AT, Basak A, Zhang P, Huigens RW, Ding Y. 2016. *In vitro* antifungal and antibiofilm activities of halogenated quinoline analogues against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Int J Antim Ag.* 48:208-211.

Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NA. 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *Plos Pathog.* 4:e1000040.

Walker LA, Gow NA, Munro CA. 2013. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:146-154.

Wallace RL, Snell TW, Ricci C. **Rotifera, Part 1: Biology, Ecology and Systematics.** In: *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*, 23. Segers H, Dumont H, Eds. Kenobi Productions and Backhuys Academic Publishing: Ghent, Belgium, 2006; p. 299.

Wang T, Wallace OB, Zhang Z, Fang H, Yang Z, Robinson BA, Spicer TP, Gong YF, Blair WS, Shi PY, Lin PF, Deshpande M, Meanwell NA, Kadow JF. 2019. A survey of core replacements in indole-based HIV-1 attachment inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 29(11):1423-1429.

Westerberg DP, Voyack MJ. 2013. Onychomycosis: current trends in diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 88(11):762-770.

Wilson TD, Steck WF. 2000. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of antiirritant properties of plant extracts. *Food Chem Toxicol.* 38(10):867-872.

Windels CE. 2000. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the northern great plains. *Phytopatho.* 90:17-21.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in U.S. hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 39:309-317.

Wojtowicz H, Kloc K, Maliszewska I, Mlochowski J, Pietka M, et al. 2004. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *Farmaco.* 59:863-868.

Youssef AB, Kallel A, Azaiz Z, Jemel S, Bada N, Chouchen A, Belhadj-Salah N, Fakhfakh N, Belhadj S, Kallel K. 2018. Onychomycosis: Which fungal species are involved? Experience of the Laboratory of Parasitology-Mycology of the Rabta Hospital of Tunis. *J Mycol Med.* 28(4):651-654.

Zanardi D, Nunes DH, Pacheco AS, Tubone MQ, Souza JJ Filho. 2008. Evaluation of the diagnostic methods of onychomycosis. *An Bras Dermatol.* 83:119-124.

Zhang MZ, Chen Q, Yang GF. 2014. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. *Eur J Med Chem.* 89:421-441.

Zhang Q, Zhu D, Ding J, Zheng F, Zhou S, Lu T, Zhu Yg, Qian H. 2019. The fungicide azoxystrobin perturbs the gut microbiota community and enriches antibiotic resistance genes in *enchytraeus crypticus*. 131:104965.

Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. 2017. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Front Microbiol.* 8:1927.

9. APÊNDICES

9.1. Efeitos ecotoxicológicos de 8-hidroxiquinolinas em *Lecane quadridentata*

Em parceria com a Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA - México), foi realizada uma visita técnica com a finalidade de compreender e realizar ensaios ecotoxicológicos, que são importantes para verificar o impacto de fungicidas agrícolas no ambiente aquático. Estes ensaios são um capítulo à parte do que estava sendo desenvolvido, pois avaliamos as 8-hidroxiquinolinas (PH 151 e 8HQ), sintetizadas pelo Grupo de Síntese Farmacêutica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Essas moléculas apresentam um potencial para utilização como fungicidas, por esse motivo foram selecionadas. De forma paralela foi verificado o dano ecológico do fungicida Mancozeb, amplamente aplicado na agricultura.

9.1.1. Coleção e cultura de rotíferos

O rotífero de água doce *Lecane quadridentata* foi cultivado em câmara bioclimática na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Perez-Legaspi & Rico-Martínez, 1998). Os rotíferos foram mantidos em placas de petri com meio sintético EPA de água doce (96 mg NaHCO_3 , 60 mg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60 mg MgSO_4 e 4 mg KCl por litro) com pH 7,5 em água desionizada (U.S. EPA, 1985) e alimentados com a alga verde *Nannochloris oculata* (estirpe LB2194 da Coleção da Universidade do Texas) cultivada em Bold's Basal Medium.

9.1.2. Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado de acordo com Pérez-Legaspi, Quintanar & Rico-Martínez (2012). Neonatos de *L. quadridentata* com menos de 24h de eclosão de cistos foram adicionados em uma placa de poliestireno de 24 poços (dez neonatos por poço, cinco repetições) com um volume de teste final de 1 mL. Para o teste definitivo testamos cinco concentrações (0,001; 0,05; 0,1; 0,5 e 1 mg/L) do Mancozeb, PH 151 e 8HQ. O controle negativo contendo os neonatos e o meio EPA pH 7,5 foi realizado em paralelo. Os rotíferos foram incubados por 24h a 25°C na ausência de

nutrientes. No final da incubação, os rotíferos imobilizados foram contabilizados utilizando um estereomicroscópio. Uma análise unidirecional ou variância (ANOVA) e teste de Duncan foram calculadas para comparar as porcentagens de mortalidade para cada concentração de substância em relação ao controle controle. A partir destes dados, o NOEC (Concentração de efeito não observado) e LOEC (concentração de efeito observado) foram calculados.

9.1.3. Toxicidade aguda após exposição de *Lecane quadridentata* às 8-hidroxiquinolinas e ao Mancozeb.

Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda utilizando o rotífero *L. quadridentata* (Tabela 1) demonstraram que a molécula PH 151 foi letal para os rotíferos em concentrações maiores (LC₅₀: 3,8; LC₁₀: 2,08; LOEC: 3; NOEC: 0,5) em comparação com o Mancozeb (LC₅₀: 0,074; LC₁₀: 0,019; LOEC: 0,05; NOEC: 0,001) e com a 8HQ (LC₅₀: 0,072; LC₁₀: 0,012; LOEC: 0,05; NOEC: 0,001), sendo então mais segura para o ecossistema aquático. Lembrando que o Mancozeb é um dos fungicidas comerciais mais utilizados na agricultura e foi classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária como altamente prejudicial ao ecossistema, possuindo um alto teor carcinogênico, mutagênico e teratogênico. Esses padrões de toxicidade são um alerta para o desenvolvimento de fungicidas com um padrão de segurança tanto para o ecossistema, como para os seres humanos.

Este estudo encontra-se em andamento na Universidad Autónoma de Aguascalientes/México, onde será verificada a toxicidade crônica das 8-hidroxiquinolinas no modelo de ecotoxicidade utilizando o *L. quadridentata*. Alguns resultados prévios da toxicidade crônica já foram obtidos em 48h para o Mancozeb (Tabela 1), ao avaliar diferentes concentrações do fungicida (0,01; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/L).

Tabela 1: Análise da toxicidade aguda do Mancozeb, PH 151 e 8HQ (mg/L) em *Lecane quadridentata*.

Fungicida	LC50 (mg/L)	LC10 (mg/L)	r2	LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
24h					
Mancozeb	0,074	0,019	0.73	0,05	0,001
PH-151	3,80	2,08	0.81	3	0,5

8HQ	0,072	0,012	0.71	0,05	0,001
48h					
Mancozeb	0,141	0,044	0,72	0,1	0,01
PH-151	-	-	-	-	-
8HQ	-	-	-	-	-

LC₅₀: concentração letal onde 50% dos animais morrem; LC₁₀: concentração letal onde 10% dos animais morrem, LOEC: concentração de efeito observada; NOEC: nenhuma concentração de efeito observada; r²: coeficiente de determinação para esses resultados.

Referências

- Pérez-Legaspi IA, Rico-Martínez R. 1998. Effect of temperature and food concentration in two species of littoral rotifers. *Hydrobiol.* 387:341-348.
- Pérez-Legaspi IA, Quintanar JL, Rico-Martínez R. 2012. Comparing toxicity endpoints on *Lecane quadridentata* (Rotifera: Monogononta) exposed to two anticholinesterases pesticides. *Environment Toxicology.* 27:518-525.