

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

Magda Antunes de Chaves

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA OU ANTIBIOFILME DE
FÁRMACOS COM POTENCIAL DE REPOSICIONAMENTO COMBINADOS COM
ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS FRENTE A FUNGOS DE DIFÍCIL TRATAMENTO**

Porto Alegre

2022

Magda Antunes de Chaves
Mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA OU ANTIBIOFILME DE
FÁRMACOS COM POTENCIAL DE REPOSICIONAMENTO COMBINADOS COM
ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS FRENTE A FUNGOS DE DIFÍCIL TRATAMENTO

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 doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Áreas de concentração: Microbiologia Clínica e Agrícola

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Porto Alegre
2022

CIP - Catalogação na Publicação

Antunes de Chaves, Magda
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA OU ANTIBIOFILME
DE FÁRMACOS COM POTENCIAL DE REPOSICIONAMENTO
COMBINADOS COM ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS FRENTE A FUNGOS
DE DIFÍCIL TRATAMENTO / Magda Antunes de Chaves. --
2022.

237 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, 2022.

1. Antifúngicos. 2. Resistência. 3. Biofilmes. 4.
Fungos. 5. Alvos terapêuticos. I. Meneghello
Fuentefria, Alexandre, orient. II. Título.

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

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

Dedico esta Tese a minha mãe, Maria
Lúcia que me fez voar longe e acreditar
nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Jesus Cristo por ter iluminado o meu caminho e permitido que eu realizasse os meus sonhos. Não foi nada fácil, para uma conquista tão importante como essa, eu precisei renunciar outras. Foram muitos anos de estudo, muita dedicação, muitas horas em uma bancada, infinitas horas na frente de um computador, dores nas costas, dores no corpo... Mas ao refletir sobre isso, eu vejo como valeu a pena. Que a honra seja dada ao meu Deus e à minha família, em especial à minha mãe, que não mediu esforços para que eu estudasse e se cheguei até aqui, foi pelo apoio incondicional dela e eu dedico minha tese a ela. É com imenso amor que eu agradeço ao meu marido Pablo e minha filhinha Isabeli pelo apoio e compreensão, pelos tantos momentos de ausência, principalmente para ela, que tão pequena suportou. Agradeço com muito carinho ao meu irmão Márcio e minha cunhada Bruna, que foram muito importantes na minha caminhada e apoiaram inclusive financeiramente.

Um agradecimento especial também dedico ao meu orientador de doutorado, Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria, sem ele essa tese também não seria possível, o apoio, as palavras de incentivo, a ajuda na construção do currículo, a compreensão dada, os direcionamentos quando me senti perdida, muito obrigada! Eu te levarei comigo na minha vida profissional, como um exemplo a ser seguido, exemplo de professor e sobretudo de orientador. Também não poderia deixar de agradecer as minhas companheiras de laboratório, Bárbara, Paulinha, Gabi e Priscilla, vocês tornaram os dias mais alegres, muitas risadas, muitas conversas, tantos desabafos e incertezas foram compartilhados. Foi um prazer dividir esses anos com vocês, e espero encontrá-las no futuro com os sonhos realizados.

Além disso, gostaria de agradecer aos professores do PPGMAA, pela dedicação e conhecimento compartilhado. Por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA OU ANTIBIOFILME DE FÁRMACOS COM POTENCIAL DE REPOSICIONAMENTO COMBINADOS COM ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS FRENTE A FUNGOS DE DIFÍCIL TRATAMENTO

Autor: Magda Antunes de Chaves

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentesfria

RESUMO

Fungos ambientais podem causar infecções em plantas, humanos e animais. Na agricultura pela exposição prévia aos fungicidas agrícolas, eles têm se tornado resistentes e na interface campo cidade, muitos têm o potencial de infectar humanos e ocasionar infecções de difícil tratamento, o que tem gerado uma busca incessante por novas alternativas de combate as infecções fúngicas. Nesse contexto, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar a atividade antifúngica ou antibiofilme de fármacos com potencial de reposicionamento associados a diferentes agentes antifúngicos recomendados para o combate de fungos envolvidos em micoses superficiais. Também foi contextualizado a resistência do complexo de espécies de *Fusarium graminearum* aos fungicidas agrícolas; o perfil de suscetibilidade de fungos envolvidos em micoses humanas e a busca por novos alvos terapêuticos por docking molecular. Para tanto, diferentes metodologias foram utilizadas a fim de encontrar a CIM, CAM e CMEB dos fármacos, bem como estabelecer as combinações e o tempo de morte das células fúngicas na forma planctônica ou séssil. Também foram avaliadas a alergenicidade e citotoxicidade das associações, bem como realizadas análises *in vitro* de toxicidade para as combinações, e previsão de novos alvos terapêuticos por meio dos web servidores PASS, SwissTargetPrediction, e Cortellis Drug Discovery Intelligence. Nós observamos que as associações CLIO-VRC e CLIO-CPX impediram a formação de biofilme por *Fusarium spp.*, bem como a associação CLIO-CPX foi capaz de remover *in vitro* os biofilmes dos dermatófitos. Além disso, nenhuma das associações foi alergênica ou citotóxica *in vitro* e resultados positivos foram encontrados nos ensaios *in vitro*. Quanto à resistência aos fungicidas agrícolas ela pode influenciar na elevação da produção de micotoxinas, e embora exista um arsenal terapêutico disponível para o combate das infecções fúngicas na clínica médica humana, nem todos os antifúngicos são eficazes na eliminação de todos os microrganismos fúngicos, sendo o teste de suscetibilidade uma ferramenta importante para revelar a melhor opção terapêutica. Por fim, encontramos pelos programas computacionais Switt target e PASS novos alvos terapêuticos para a nitroxolina, um antibacteriano com potencial de reposicionamento. Finalmente, concluímos que o tratamento para as micoses humanas e agrícolas envolve a adoção de medidas que visem impedir a resistência, uma vez que ela é um dos principais problemas relacionados às doenças fúngicas.

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. (237 p.) maio, 2022.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA OU ANTIBIOFILME DE FÁRMACOS COM
POTENCIAL DE REPOSICIONAMENTO COMBINADOS COM ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS
FRENTE A FUNGOS DE DIFÍCIL TRATAMENTO

Author: Magda Antunes de Chaves

Advisor: Alexandre Meneghello Fuentefria

ABSTRACT

Environmental fungi can cause infections in plants, humans, and animals. In agriculture, due to previous exposure to agricultural fungicides, they have become resistant and at the field-city interface, many have the potential to infect humans and cause difficult-to-treat infections, which has generated an incessant search for new alternatives to combat fungal infections. In this context, the main objective of the present work was to investigate the antifungal or antibiofilm activity of drugs with repositioning potential associated with different antifungal agents recommended for combating fungi involved in superficial mycoses. The resistance of the *Fusarium graminearum* species complex to agricultural fungicides was also contextualized; the susceptibility profile of fungi involved in human mycoses and the search for new therapeutic targets by molecular docking. For that, different methodologies were used to find the MIC, CAM, and CMEB of the drugs, as well as to establish the combinations and the death time of the fungal cells in the planktonic or sessile form. The allergenicity and cytotoxicity of the associations were also evaluated, as well as *in vitro* analyzes of toxicity for the combinations, and prediction of new therapeutic targets through the PASS, SwissTargetPrediction, and Cortellis Drug Discovery Intelligence web servers. We observed that the CLIO-VRC and CLIO-CPX associations prevented the formation of biofilms by *Fusarium* spp., as well as the CLIO-CPX association was able to remove dermatophyte biofilms *in vitro*. Furthermore, none of the associations were allergenic or cytotoxic *in vitro* and positive results were found *in vitro* assays. As for resistance to agricultural fungicides, it can influence the increase in mycotoxin production, and although there is a therapeutic arsenal available to combat fungal infections in human medical clinics, not all antifungals are effective in eliminating all fungal microorganisms, being the susceptibility testing an important tool to reveal the best therapeutic option. Finally, we found by computer programs Switt Target and Pass new therapeutic targets for nitroxoline, an antibacterial with repositioning potential. Finally, we conclude that the treatment for human and agricultural mycoses involves the adoption of measures to prevent resistance since it is one of the main problems related to fungal diseases.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (237 p.) may, 2022.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 O Reino fungi e as infecções fúngicas.....	5
3.2 O gênero <i>Fusarium</i> e as infecções fúngicas em plantas e em humanos.....	6
3.3 Os gêneros <i>Trichophyton</i> e <i>Microsporum</i> e as infecções fúngicas em humanos	11
3.4 Os biofilmes e as infecções fúngicas superficiais por <i>Fusarium</i> spp. <i>T. rubrum</i> e <i>M. canis</i>	14
3.5. Terapia antifúngica contra micoses superficiais, mecanismos de ação dos antifúngicos e dosagens recomendadas.....	27
3.6 Resistência aos antifúngicos na forma planctônica e de biofilme	28
3.7 Estratégias para o combate de infecções fúngicas.....	31
3. 8 Abordagens <i>in vitro</i>	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Locais de realização da Pesquisa	36
4.2 Cepas Fúngicas	36
4.3 Antifúngicos e preparo das soluções	37
4.4 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos antifúngicos.....	37
4.5 Investigação <i>in vitro</i> da formação de biofilme de <i>Fusarium</i> spp. e dermatófitos pelo método do cristal violeta	37
4.6 Análise da Concentração Antibiofilme Mínima dos antifúngicos selecionadas frente a espécies de <i>Fusarium</i> e dermatófitos	38
4.7 Avaliação da Concentração Mínima Erradicadora de Biofilme (CMEB) das moléculas selecionadas frente a espécies de <i>Fusarium</i> , <i>T. rubrum</i> e <i>M. canis</i> ..	40
4.8 Determinação da atividade antibiofilme dos antifúngicos comerciais pelo método de checkerboard	40
4.9 Determinação da atividade removedora de biofilme pelo método de checkerboard	41
4.10 Time-Kill Combination sobre <i>Fusarium</i> na forma plactônica.....	42
4.10.1 <i>Time-Kill Combination</i> sobre biofilme de dermatófitos	43
4.11 Determinação do potencial alergênico das associações propostas para uso em onicomicoses e ceratite por <i>Fusarium</i> spp.....	43

4.12 Avaliação do potencial citotóxico das associações propostas para uso em onicomicoses e ceratite por <i>Fusarium</i> spp.....	44
4.13 Predição da toxicidade das combinações eleitas para o combate de onicomicose e ceratite por <i>Fusarium</i> spp.	45
4.14 Predição dos mecanismos de ação da nitroxolina <i>in vitro</i> e <i>in vitro</i>	46
4.14.1 Ligação ao ergosterol exógeno.....	46
4.14.2 Ensaio de proteção do sorbitol.....	47
4.14.3 Predição <i>in vitro</i> de atividade biológica.....	47
4.14.4 Docking molecular	48
RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
Artigo 1.....	Erro! Indicador não definido.
Artigo 2.....	Erro! Indicador não definido.
Artigo 3.....	Erro! Indicador não definido.
Artigo 4	Erro! Indicador não definido.
Artigo 5	Erro! Indicador não definido.
DISCUSSÃO GERAL.....	194
CONCLUSÃO	205
REFERÊNCIAS.....	208

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas fúngicas.

Tabela 2. Classificação da produção de biofilme de acordo com a faixa de absorvância exibida quando submetida ao método do cristal violeta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das estruturas macro e micromorfológicas de *Fusarium* spp.. (a-b) verso, (c) reverso, (d) macroconídios multisseptados, (e) microconídios em polifialídes, (f) clamidósporos. Fonte: *Micology Online*.

Figura 2. Representação das características macro e micromorfológicas de *Microsporum canis*. (a) verso, (b) reverso, (c) macroconídios. Fonte: *Mycologia online*.

Figura 3. Representação das características macro e micromorfológicas de *Tricophyton rubrum*. (a) verso, (b) reverso, (c-d) macroconídios e microconídios. Fonte: *Mycologia online*.

Figura 4. Fases de formação de biofilme de fungo filamentosos. Fase I: Adsorção de propágulo. Fase II: Fixação ativa a superfície. Fase III: Formação de microcolônias. Fase IV: Maturação inicial. Fase V: Biofilme maduro e desenvolvimento reprodutivo. Fase VI: Dispersão ou fase planctônica (Fonte: Harding et al. 2009).

Figura 5. Estágios de desenvolvimento de biofilme de *Fusarium solani* por microscopia eletrônica de varredura. Tempos de formação do biofilme. 0 - 4h: Adesão celular e coagregação; 8h: Germinação; 12h: Extensão das hifas e formação de canais de água; 24h – 48h: Biofilme com sinais de maturação; 72h: Biofilme maduro com possível liberação de células sésseis (Fonte: Córdova-Alcántara et al., 2019).

Figura 6. Onicomiose por *T. rubrum* e *Fusarium*. A) Dermatofitoma. B) Onicomiose por *T. rubrum* cobrindo parcialmente a lâmina ungueal. C-D) Unhas distróficas com presença de paroníquia. E) Leuconíquia (manchas branco-amareladas) e rugosidade na lâmina ungueal. Fonte: Baran et al. (1997); Ranawaka et al. (2015); Leung et al. (2020).

Figura 7. Ceratite por *Fusarium* spp.. **A)** Abscesso na córnea. **B)** Úlcera com envolvimento da esclera. **C)** Desmetocele da córnea. Al-Hatmi et al. (2014); Bernal et al. (2015); Amadasi et al. (2017).

Figura 8. Infecção por *M. canis* em diferentes regiões anatômicas. **A)** Lesão do couro cabeludo do tipo kerion por *M. canis* e *T. mentagrophytes* em associação. **B–C)** Lesão corporal por *M. canis* em adulta idosa. **D)** Lesão por *M. canis* do tipo kerion. (Fonte: Nakagawa et al., 2018; Yang et al., 2020; Yang et al., 2021).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Anfotericina B
MICA	Micafungina
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata Dextrose Ágar
CAM	Concentração antibiofilme mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CLIO	Clioquinol
CMEB	Concentração mínima erradicadora de biofilme
CPX	Ciclopirox olamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
FGSC	Complexo de espécies de <i>Fusarium graminearum</i>
FOSC	Complexo de espécies de <i>Fusarium oxysporum</i>
FSSC	Complexo de espécies de <i>Fusarium solani</i>
HET-CAM	Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane
MTT	Brometo de 3 – (4,5 dimetiltiazol-2-il) – 2,5 difenil-tetrazólio
NTM	Natamicina
NTX	Nitroxolina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TBF	Terbinafina
TSB	Trypticasein Soy Broth
VRC	Voriconazol

1. INTRODUÇÃO

A busca pela sobrevivência é uma corrida complexa, todos os seres vivos sem exceção, buscam se estabelecer e perpetuar suas espécies. Do menor ao maior, do pequeno ou grande, todos eles estabelecem interações que podem ser benéficas ou não. Os fungos são um dos microrganismos mais antigos na terra e são responsáveis por diversas interações, estabelecem por exemplo, interação com as raízes das plantas e formam as micorrizas ou então colonizam a pele de humanos e juntos com outros microrganismos constituem a microbiota. Pode-se dizer que são imprescindíveis, a vida na terra inclusive é dependente deles, alguns são decompositores, outros são patogênicos, mas e quem disse que a patogenicidade é ruim, já que estamos todos predestinados à morte? Para um biólogo chamado Charles Darwin, isso apenas seria a seleção natural.

Obviamente que nenhuma planta, animal humano ou não, gostaria de ser infectado por um fungo. Quando ocorre, a infecção geralmente é muito difícil de tratar, nas plantas os conídios germinam e expandem suas hifas fúngicas ao longo do tecido vegetal, devorando tudo que vem pela frente, caso não combatido, a morte é certa. Como resultado, a agricultura mundial pode ser afetada e milhões de dólares são perdidos anualmente, como é o caso da fusariose em trigo. Por outro lado, milhões de dólares são perdidos anualmente com as infecções fúngicas em humanos. Embora não seja grande o número de microrganismos fúngicos patogênicos, estima-se que cerca de 300 espécies estão envolvidas, quando acometem humanos podem levar eles à morte, seja pela virulência ou resistência do microrganismo, ou então pelas debilidades do sistema imunológico.

No corpo humano, eles podem ser encontrados infectando vários sítios anatômicos, como pele, unhas, órgãos, tecidos, alguns, podem inclusive espalhar-se via corrente sanguínea e ocasionar uma infecção fúngica generalizada, outros, infectam sítios anatômicos específicos formam uma estrutura de resistência e virulência que garante sua sobrevivência e permanecem ali por anos. Esses são os casos dos gêneros *Fusarium*, *Tricophyton* e *Microsporum* que ocasionam infecções superficiais, mas difíceis de combater, como por exemplo a ceratite, a onicomicose e a infecção do couro cabeludo.

Quando esses fungos adotam o estilo de vida sésil, são cerca de 1000 vezes mais resistentes e o pouco arsenal terapêutico disponível não é capaz de eliminá-los,

já que existem várias limitações dentro da arquitetura fúngica que impedem a forte ação antifúngica. Sendo assim, uma das melhores opções para combater os biofilmes ou impedir a formação deles, é através de combinações entre fármacos, sejam antibacterianos, anti-inflamatórios, antiparasitários ou até mesmo antifúngicos. É sabido que quando dois ou mais fármacos são associados, consideráveis reduções na concentração ocorrem, além de baixa toxicidade, combate de resistência e eliminação de biofilmes. Nesse contexto, nós realizamos uma combinação entre o clioquinol e diferentes antifúngicos a fim de observar o potencial antibiofilme ou removedor de biofilme quando os mesmos foram associados.

Além disso, devido a resistência que os organismos fúngicos têm exibido nos últimos anos, assim como o aparecimento de espécies emergentes e muitas vezes resistentes a maioria dos agentes antifúngicos, técnicas *in vitro* de predição de novos alvos terapêuticos são uteis para o redirecionamento de novos fármacos, e portanto as abordagens *in vitro* também podem ser utilizadas para a descoberta de novos alvos terapêuticos. No presente trabalho, por docking molecular nós realizamos a predileção dos possíveis alvos terapêuticos da nitroxolina e também analisamos o perfil de suscetibilidade de fungos envolvidos em micoses humanas, além de observar a resistência do complexo de espécies de *Fusarium graminearum* aos fungicidas agrícolas e relacionamos com expressão de micotoxinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antifúngica ou antibiofilme de fármacos com potencial de reposicionamento associados a diferentes agentes antifúngicos recomendados para o combate de fungos envolvidos em micoses superficiais.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de suscetibilidade antifúngica do clioquinol e demais antifúngicos indicados para o tratamento de onicomicose, ceratite ou tinea capitis causadas por *Trichophyton rubrum*, *Fusarium* spp. e *Microsporum canis*.
- Investigar o potencial de formação de biofilme por *Fusarium* spp., *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*.
- Determinar *in vitro* a Concentração Antibiofilme Mínima (CAM) e a Concentração Mínima Erradicadora de Biofilme (CMEB) dos antifúngicos selecionadas frente a dermatófitos e não-dermatófitos.
- Determinar por Checkerboard (CK) e por Time Kill Combination (TKC) as mais eficazes combinações para a ação preventiva e/ou removedora de biofilmes fúngicos causados por fungos filamentosos.
- Determinar o potencial citotóxico e alergênico da melhor combinação frente a espécies de *Fusarium* causadoras de onicomicose e ceratite.
- Investigar os mecanismos de ação da nitroxolina *in vitro* e *in vitro*.
- Avaliar o impacto da resistência do complexo de espécies de *Fusarium graminearum* aos fungicidas agrícolas.

- Reunir os diferentes perfis de suscetibilidade de fungos envolvidos em infecções fúngicas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O Reino fungi e as infecções fúngicas

O reino fungi é considerado um dos maiores reinos de organismos vivos, é encontrado em todas as zonas de temperatura da terra, e composto por aproximadamente 6 milhões de espécies fúngicas que juntas constituem um grupo diverso, formado por uma ampla variedade de ciclos de vida, metabolismo, morfogênese e ecologia (Choi & Kim, 2017). Por conta disso, os fungos são considerados os principais atores na maioria dos ecossistemas, além disso, enquanto uns são extremos, outros são muito comuns (Magan, 2007; Janbon et al., 2019). Alguns inclusive ocasionam doenças em plantas, como também podem evoluir de maneira que sejam capazes de infectar humanos e animais, outros podem ser sapróbios do solo ou viver sobre matéria orgânica em decomposição e quando em contato com humanos podem ocasionar infecções (De Chaves et al., 2020; De Chaves et al., 2022).

Estima-se que diariamente, os seres humanos inalam entre 1.000 a 10 bilhões de células reprodutivas fúngicas (American Academy of Microbiology, 2017) e apesar da grande quantidade, felizmente nem todas são patogênicas. No entanto, cerca de 600 espécies fúngicas estão associadas a humanos em processos comensais, como parte do microbioma ou em casos de patogenia, sendo que destas, cerca de 300 infectam humanos (American Academy of Microbiology, 2017; Lionakis & Levitz, 2017). Contudo, poucas são graves, uma vez que a temperatura corporal é um forte impedimento para patógenos fúngicos (Robert & Casadevall, 2009). Todavia, indivíduos com debilidades no sistema imunológico podem ser acometidos por infecções fúngicas com maior frequência do que aqueles que são saudáveis, que por sua vez também correm o risco de ser afetados por patógenos fúngicos, especialmente os emergentes (American Academy of Microbiology, 2017). Porém, são várias as infecções fúngicas que esses microrganismos podem ocasionar e elas variam desde infecções superficiais a invasivas e disseminadas (Sidrim & Rocha, 2012).

Nesse contexto, acredita-se que cerca de 1 bilhão de pessoas são afetadas anualmente por micoses superficiais, 4,9 milhões por infecções invasivas e 20 milhões apresentam doenças fúngicas alérgicas, e estima-se que elas matam mais de 1,5 milhões de pessoas por ano (Bongomin et al., 2017). Sendo assim, o impacto dos

fungos para a saúde humana e a economia é alarmante, pois as infecções fúngicas custaram para os EUA em 2019 mais de 7,2 bilhões de dólares (Benedict et al., 2019). Ao passo que no Brasil, infelizmente, as infecções fúngicas são negligenciadas pelas autoridades de saúde pública, uma vez que não se tem um banco de dados oficial sobre infecções fúngicas notificadas, o que acaba por prejudicar a aquisição de dados epidemiológicos e mascara a prevalência de infecções fúngicas superficiais ou invasivas no país (Giacomazzi et al., 2016). Apesar disso, a pesquisa de Giacomazzi et al. (2016) estima que 3,8 milhões de brasileiros são afetados por infecções fúngicas graves.

Obviamente que alguns desses microrganismos causadores de infecções desenvolveram mecanismos que os capacitassem para infecções em humanos ou animais, tais como os dermatófitos que utilizam a queratina presente na pele, cabelo e unhas (Costa-Orlandi et al., 2014). Por outro lado, outros em situações de oportunismo multiplicam-se em demasia espalhando-se por todo o corpo e ocasionando infecções fúngicas sistêmicas, como é o caso de algumas espécies de *Candida* vinculadas à endoftalmite endógena (Zhuang et al., 2020). Enquanto outros, emergiram do campo, por meio da forte utilização de agroquímicos utilizados para combatê-los como fitopatógenos de culturas agrícolas e tem ocasionado doenças de difícil tratamento na clínica médica humana, algumas espécies de *Fusarium*, por exemplo (Batista et al., 2020). Contudo, por mais alarmante que seja a ameaça direta que os fungos representam à saúde humana, ela é superada pelo efeito indireto das doenças fúngicas das plantas que comprometem a segurança alimentar mundial. Os fungos são responsáveis por epidemias capazes de matar ou reduzir a produção de alimentos básicos, tais como arroz, trigo e milho, além disso podem produzir micotoxinas que quando ingeridas podem resultar em problemas imunológicos, teratogênicos ou até mesmo câncer (American Academy of Microbiology, 2017).

3.2 O gênero *Fusarium* e as infecções fúngicas em plantas e em humanos

3.2.1 Características gerais do gênero

Fusarium sp. pode ser observado em diversos ambientes, como solo, água, ar, detritos orgânicos ou até mesmo plantas (Al-Maqtoofi & Thornton, 2016; Tupaki-Sreepurna & Kindo, 2018). Como é um microrganismo ubíquo, algumas

espécies são saprofíticas e outras ocasionam doenças em plantas, logo, algumas também são patogênicas de humanos e animais, como *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. fujikuroi* entre outras (Galletti et al., 2015; Al-Hatmi et al., 2016; Halfeld-Vieira et al., 2016; Herkert et al., 2019).

Embora seja um gênero emergente quando se trata de infecções em humanos, as células em formato de bananas foram observadas pela primeira vez em 1809, no entanto apenas em 1821 foram chamadas de *Fusarium* (Summerell, 2019). Nos anos seguintes, amplas revisões taxonômicas foram realizadas até que em 1971 o gênero foi reconhecido e incorporado a ele 44 espécies, as quais foram analisadas quanto as características morfológicas, como microconídios e estruturas reprodutivas sexuais, que poderiam ser utilizadas para diferenciá-las (Summerell, 2019). Atualmente o gênero conta com cerca de 300 espécies que estão incluídas no reino Fungi, sub-reino Eumicota, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Hypocreales, família Nectriaceae (Munkvold, 2017; Taheri, 2018).

Ainda que tenha um número bem significativo de espécies, devido as similaridades genéticas e fenotípicas que elas exibem entre si, as mesmas estão distribuídas em complexos de espécies (SC) e até o momento são reconhecidos 22 complexos, sendo que dez deles têm maior importância para a saúde humana (*F. solani* - FSSC, *F. oxysporum* - FOOSC, *F. sambucinum* – FSSC, *F. dimerum* - FDSC, *F. fujikuroi* - FFSC, *F. lateritium* FLSC, *Fusarium incarnatum-equisetti*- FIESC, *F. tricinctum* (FTSC), *F. dimerum* - FDSC e *F. chlamydosporum* - FCSC (Al-Hatmi et al., 2016; Najafzadeh et al., 2020). Enquanto para a agricultura um dos mais importantes é o *F. graminearum* - FGSC que está envolvido em perdas econômicas altíssimas tanto para os agricultores quanto para diversos setores envolvidos na comercialização de diferentes cereais (De Chaves et al., 2022).

Todavia, quando se trata de reprodução, o gênero é bem versátil, algumas espécies se reproduzem de maneira assexuada (*F. sporotrichioides*, *F. succisae*, *F. venenatum*, etc), enquanto outras exibem os dois tipos de reprodução, como é o caso de *F. graminearum*, *F. solani*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. No entanto, para que o cruzamento ocorra, um conídio ou fragmento de hifa doa o núcleo para um protoperitécio de uma cepa com reprodução oposta, quando a fertilização ocorre, o desenvolvimento do peritécio se inicia, levando à meiose e a formação do asco e dos ascósporos (Leslie & Summerell, 2006). Durante o processo infeccioso no trigo por

exemplo, o microrganismo produz ascósporos e conídios para suportar as condições ambientais desfavoráveis e aumentar seu número e distribuição na planta (Son et al., 2014). Ainda que a reprodução assexuada seja a maneira mais importante de reprodução fúngica e auxilie na dispersão do fungo e manutenção de uma epidemia, a reprodução sexual é importante para garantir a variação genética (Qi et al., 2018).

Em condições laboratoriais, as espécies que compõem o gênero crescem em meios de cultura sem cicloheximida e variam em cor, além de algumas produzirem pigmentos violáceos que se difundem sobre o meio de cultura, tais como as que compõem o FSSC (Tupaki-Sreepurna & Kindo, 2018). No ágar batata dextrose, por exemplo, podem exibir colônias com uma superfície aveludada ou algodoadada, com coloração variada na superfície (branco, amarelo, roxo, rosa, salmão ou cinza), enquanto que no reverso, pode ser observada coloração pálida, vermelha, violácea, marrom ou até mesmo azul (Figura1) (Tupaki-Sreepurna & Kindo, 2018).

Quando analisada a micromorfologia, observam-se hifas hialinas, septadas e ramificadas, cujo micélio aéreo é capaz de produzir diferentes tipos de conídios denominados macroconídios ou microconídios (Tupaki-Sreepurna & Kindo, 2018). Os macroconídios são clássicos para a identificação de *Fusarium* sp. e como já mencionado, remontam ao formato de canoas ou bananas multisseptadas falcadas com um ápice em bico e uma célula basal pedicelada, e são originados em monofialides ou polifialides presentes em estruturas conhecidas como esporodóquios. Por outro lado, os microconídios são curtos, com formato piriformes, fusiformes ou ovais e podem ter uma ou duas septações (Al-Hatmi et al., 2016; Lainhart et al., 2018). Uma outra característica importante, é a produção de clamidósporos que são estruturas de reprodução localizadas lateralmente ou entre as hifas (Tupaki-Sreepurna & Kindo, 2018).

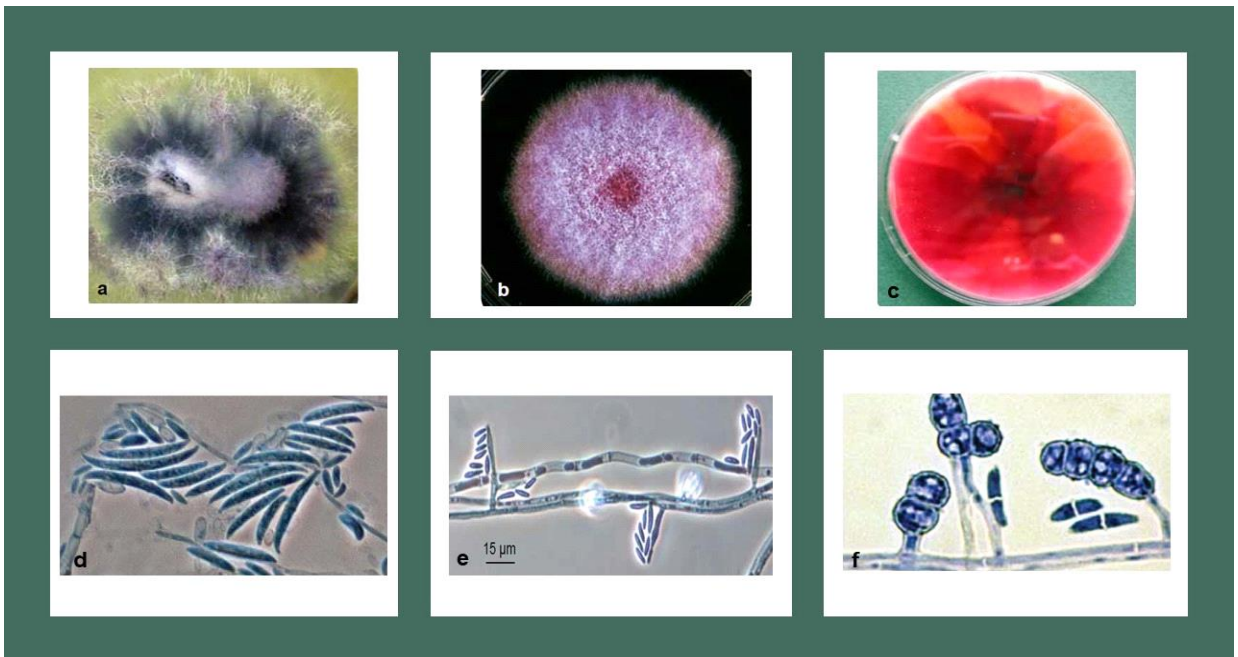


Figura 1. Representação das estruturas macro e micromorfológicas de *Fusarium* spp.. (a-b) verso, (c) reverso, (d) macroconídios multisseptados, (e) microconídios em polifialídes, (f) clamidósporos. Fonte: *Micology Online*.

No laboratório clínico, a identificação de *Fusarium* ocorre até o nível de gênero, uma vez que a identificação ao nível de espécie é bem difícil por conta das similaridades que as espécies exibem entre si, dessa maneira, quando necessário identificar a espécie, opta-se pela identificação molecular, que geralmente envolve a utilização de PCR seguido por sequenciamento (Lainhart et al., 2018).

3.2.1.1 Infecções fúngicas de *Fusarium* em plantas

Não são poucas as plantas que *Fusarium* pode infectar, são descritas na literatura, infecções em abacaxi, tomate, ervilha, pepino, banana, arroz, cevada, centeio, etc (El-Sharkawy et al., 2020; Zhao et al., 2021). Mas uma das infecções que tem muito destaque por interferir na saúde dos consumidores e por questões econômicas, uma vez que traz prejuízos à agricultura mundial, envolve o complexo de espécies de *Fusarium graminearum* (FGSC), este por sua vez tem se destacado quanto ao seu potencial de patogenicidade, resistência e produção de micotoxinas em grãos de trigo (De Chaves et al., 2022).

3.2.1.2 Infecções fúngicas por *Fusarium* em humanos

Nos humanos é um verdadeiro patógeno oportunista e foi reconhecido por ocasionar fusarioses na década de 50. Embora as infecções ocorram principalmente em áreas tropicais e subtropicais, *Fusarium* foi considerado um patógeno global apenas nas últimas três décadas (Al-Hatmi et al., 2016). É um fungo capaz de ocasionar uma ampla gama de infecções e todas elas são de difícil tratamento, estando envolvido em casos de fungemia, micetoma, infecção de pele, doenças nos pulmões (incluindo doenças alérgicas e pneumonia), entre outras (Lainhart et al., 2018; Thomas et al., 2020). Algumas são raras, como endocardite, infecções do trato urinário e osteomielite, outras, porém são mais frequentes, como a ceratite e a onicomicose (Tupaki-Sreenpurna et al., 2018; Lainhart et al., 2018). Por conta da ampla gama de infecções, as fusarioses estão classificadas como a terceira causa mais comum de infecções por fungos filamentosos, anteceditos apenas por aspergilose e zigomicose (Tupaki-Sreenpurna et al., 2018).

Obviamente que as espécies são muito versáteis e têm diferentes predileções por determinadas regiões no corpo, por exemplo, *F. falciforme* e *F. keratoplasticum* são frequentemente recuperadas de infecções superficiais, enquanto *F. petroliphilum* é comum em infecções disseminadas (Al-Hatmi et al., 2016; Muraosa et al., 2017). Contudo, independente do sítio anatômico, a maioria das espécies de relevância clínica estão incluídas dentro dos principais complexos de espécies que são o FSSC e o FOSSC, representando aproximadamente 80% das infecções (Al-Hatmi et al., 2016). Todavia, as infecções dependem muito das condições de saúde do hospedeiro, por exemplo, pacientes imunocompetentes, podem ser acometidos por infecções superficiais como onicomicose e ceratite, geralmente infecções localizadas ocasionadas por trauma e raramente se disseminam. Enquanto indivíduos imunocomprometidos que podem ter deficiências hematológicas como imunodeficiência grave das células T, ou que passaram por transplantes de órgãos ou exibem neutropenia prolongada podem desenvolver fusariose invasiva, que ocorre principalmente pela inalação dos conídios com subsequente disseminação hematogênica (Lainhart et al., 2018; Rosa et al., 2019).

Como observado acima, há uma ampla gama de infecções que são ocasionadas por *Fusarium* spp., contudo este trabalho se limitará apenas a

abordagem e aprofundamento das doenças superficiais, como por exemplo ceratite e onicomicose.

3.3 Os gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* e as infecções fúngicas em humanos

3.3.1 Características gerais dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*

Enquanto *Fusarium* spp. é um gênero emergente em humanos, *Trichophyton* sp. e *Microsporum* sp. pertencem a um grupo antigo de microrganismos que são considerados um problema de saúde pública por conta do alto poder de transmissibilidade que eles possuem (Dabas et al., 2017; Martinez-Rossi et al. 2017). Esses fungos foram observados pela primeira vez em 1841 por Robert Remak e David Gruby, e são chamados de dermatófitos porque compõem um grupo de microrganismos constituído por fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos e que se assemelham filogeneticamente (Mezzari e Fuentefria, 2012; Sidrim e Rocha, 2012; De Hoog et al., 2017). Dessa maneira, estão incluídos no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Euascomycetes, Ordem Onygenales e família Arthrodermataceae (Rouzaud et al., 2016).

São fungos que possuem habitat variável, e podem ser classificados como fungos geofílicos, zoofílicos ou antropofílicos. Espécies que são antropofílicas, colonizam naturalmente os humanos, sendo transmitidas entre eles e geralmente ocasionam infecções crônicas, leves, não-inflamatórias, atingindo proporções epidérmicas, tais como *Trichophyton rubrum*. Por outro lado, as espécies zoofílicas vivem em associação com animais e podem infectar humanos através de seus reservatórios, ou seja, podem estar na pele dos animais tanto sintomaticamente quanto assintomaticamente (*Microsporum canis*). Já os dermatófitos geofílicos têm seu habitat no solo, vivendo sobre tecidos queratinosos em decomposição. Quando transmitidas aos humanos, as espécies geofílicas (*M. gypseum*) e zoofílicas ocasionam micoses inflamatórias agudas (De Hoog et al., 2017). Ainda que as espécies variem quanto ao habitat, acredita-se que a origem dos dermatófitos patogênicos seja proveniente de espécies ancestrais geofílicas, que poderiam ser pré-adaptadas a patogênese cutânea, uma vez que eram capazes de decompor queratina de pelos ou penas presentes no solo (Weitzman & Summerbell, 1995).

Atualmente estão incluídas no gênero *Microsporium* aproximadamente 14 espécies, com *M. canis* representando uma das principais relacionadas ao gênero. Por outro lado, *Trichophyton* sp. possui cerca de 20 espécies com *T. rubrum* sendo um dos principais representantes (Mezzari e Fuentefria, 2012, Rocha e Sidrim, 2012). No que tange aos aspectos macro e micromorfológicos, *M. canis* apresenta crescimento rápido em ágar Sabouraud que pode variar entre 6 e 10 dias. As colônias apresentam aspecto algodinoso, com discreto relevo umbilicado e radiado, de tonalidade branca, cujo reverso exhibe coloração amarelo-limão que com o passar do tempo pode-se difundir no meio e torná-lo castanho. No microscópio óptico, *M. canis* apresenta grande quantidade de macroconídios fusiformes de paredes grossas e com vários septos, geralmente entre 5 a 7 (Figura 2) (Sidrim e Rocha, 2012).

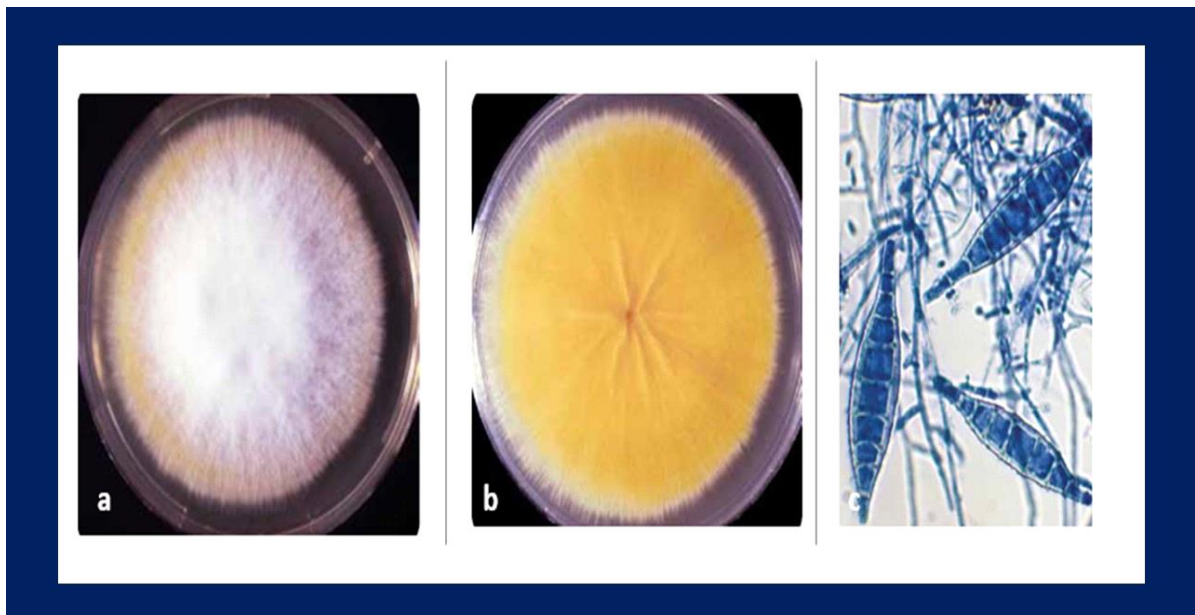


Figura 2. Representação das características macro e micromorfológicas de *Microsporium canis*. (a) verso, (b) reverso, (c) macroconídios. Fonte: *Mycologia online*.

Diferentemente de *M. canis* que produz grande quantidade de macroconídios, *Trichophyton* spp. produz uma grande quantidade de microconídios, e estes podem ser piriformes, ovulares ou redondos, dispostos em acládium ou em cachos, os macroconídios por sua vez, quando presentes, exibem aspecto de clavas alongadas

com duas a nove septações, cujas paredes são lisas e podem estar dispostos lateralmente, diretamente nas hifas ou em pedicelos curtos (Figura 3). Comparado a *M. canis*, *T. rubrum* por exemplo, exibe crescimento intermediário desenvolvendo-se entre 12 e 16 dias em ágar Sabouraud, as colônias aparentam textura algodonosa ou velutosa cujas pregas radiais formam uma pequena saliência no centro da colônia (Kidd et al., 2016; Sidrim e Rocha, 2012).

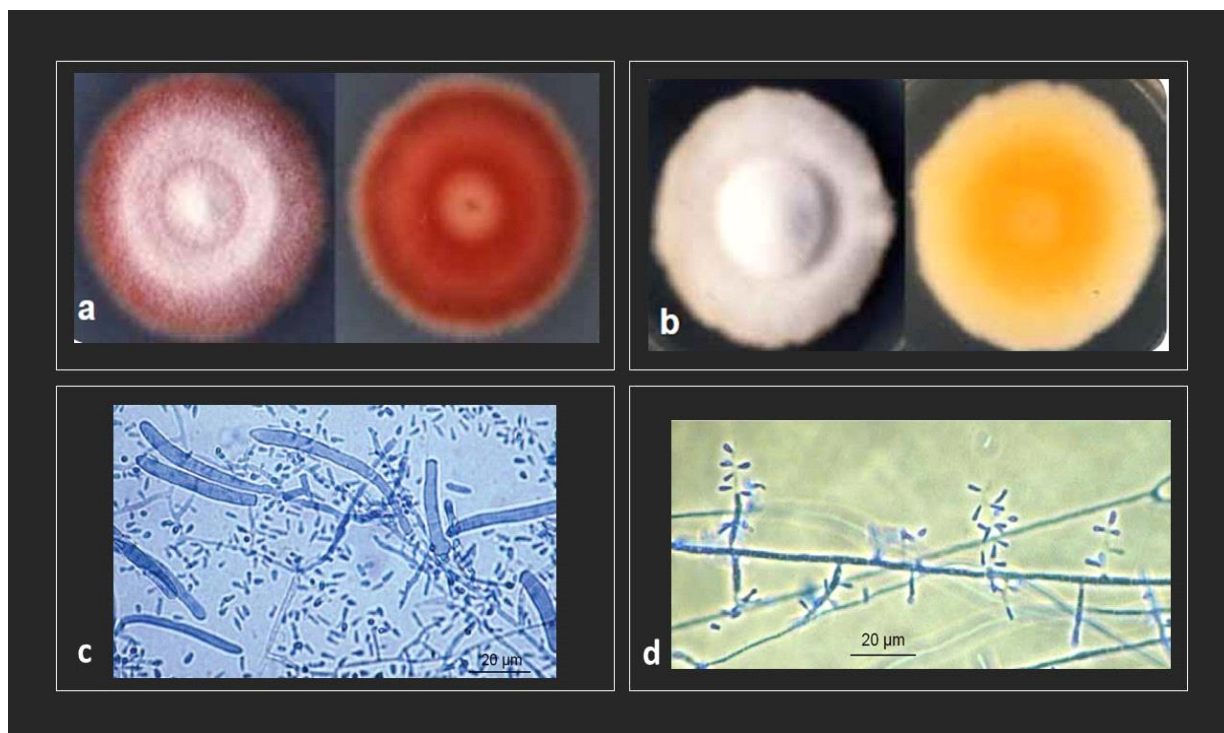


Figura 3. Representação das características macro e micromorfológicas de *Tricophyton rubrum*. (a) verso, (b) reverso, (c-d) macroconídios e microconídios.
Fonte: *Mycologia online*.

No laboratório clínico, o padrão-ouro para o diagnóstico desses microrganismos envolve a observação das estruturas fúngicas por microscopia óptica, que são clarificadas com hidróxido de potássio (KOH) 40%, e posterior observação das estruturas fúngicas por meio do cultivo do microrganismo. Além disso, pode-se adotar a utilização de técnicas de diagnóstico molecular para melhorar a sensibilidade e diminuir a espera do resultado (Ross et al. 2020). Nesse contexto, várias técnicas baseadas em DNA podem ser utilizadas, por exemplo, PCR espécie-específica, PCR-

RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de reação em cadeia da polimerase), além de PCR em tempo real (Ahmadi et al. 2015).

3.3.1.1 Infecções fúngicas por *Trichophyton rubrum* e *M. canis*

Diferentemente de *Fusarium* sp. que pode infectar vários tipos de tecidos anatômicos, os dermatófitos são restritos a tecidos queratinizados pois são capazes de invadir e sobreviver nessas estruturas, onde utilizam a queratina como fonte de nutriente e ocasionam preferencialmente micoses cutâneas que são chamadas de tineas e classificadas de acordo com a região onde são encontradas (Andrade et al. 2019).

Dentre os dermatófitos, *Trichophyton* sp. é um dos fungos de maior importância médica, e como já mencionado *T. rubrum* é a espécie mais relevante pois é responsável por aproximadamente 80% de todas as infecções por dermatófitos, e é a espécie mais isolada, especialmente em casos de tinea unguium (Lang et al. 2019). A alta prevalência de *T. rubrum* deve-se ao fato de a espécie ser refratária ao tratamento usual devido à grande adaptação ao hospedeiro humano (Dalla Lana et al. 2018). Por outro lado, *M. canis* é a espécie mais transmitida de pequenos animais para humanos e está relacionada principalmente a tinea capitis, uma infecção do cabelo e couro cabeludo (Zhi et al., 2020).

As infecções por dermatófitos podem afetar cerca de 40% da população humana e estima-se que entre 10 a 15% da população será infectada por esses fungos pelo menos uma vez durante a vida (Andrade et al. 2019). As dermatofitoses são altamente contagiosas, uma vez que podem se disseminar por contato direto ou indireto, seja pela exposição aos esporos fúngicos que podem ser liberados pela descamação cutânea, pelos de animais infectados ou fômites contaminados que podem ser fonte de infecção e reinfecção (Andrade et al. 2019).

3.4 Os biofilmes e as infecções fúngicas superficiais por *Fusarium* spp. *T. rubrum* e *M. canis*

Os biofilmes são a forma de vida mais bem sucedida na terra e foram descritos pela primeira vez em 1936 (Zobell & Anders, ANO; Flemming & Wingender, 2010). Desde então, grandes avanços foram feitos e que ocasionaram mudanças

consideráveis no entendimento sobre a forma como os microrganismos sobrevivem em ambientes naturais ou até mesmo em tecidos de hospedeiros (Harding et al., 2009). Hoje, sabe-se que na maior parte do tempo, os microrganismos vivem aderidos a superfícies bióticas ou abióticas e formam comunidades que são revestidas por uma matriz polimérica extracelular, capaz de os proteger dos efeitos adversos do ambiente (Mukherjee et al. 2012). Nesse tipo de comportamento, são altamente resistentes aos antimicrobianos, pois a matriz diminui a suscetibilidade aos fármacos, uma vez que age como uma barreira física que dificulta a penetração deste no biofilme (Vila et al., 2015).

Vários são os microrganismos formadores de biofilmes e nas últimas décadas têm sido demonstrado que muitos fungos filamentosos têm o potencial de formar biofilmes e quando eles adotam esse estilo de vida, têm proteção celular, aumento da virulência, tolerância aumentada ao stress ambiental e físico, além de cooperação metabólica e expressão diferenciada de genes quando comparados às células planctônicas (Brilhante et al. 2017; Córdova-Alcántara et al., 2019).

Toda essa proteção, deve-se principalmente a matriz que é considerada um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros e que tem um papel crucial na manutenção do biofilme, pois é constituída por vários elementos como polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos, que juntos fornecem a estabilidade mecânica para o biofilme, medeiam a adesão a superfícies, além de formar uma rede tridimensional coesa que interconecta e imobiliza transitoriamente as células do biofilme (Flemming & Wingender, 2010). Nela também estão presentes diversas moléculas que são responsáveis pela comunicação celular dentro do biofilme (Azeredo et al. 2017). Dessa maneira, no biofilme a matriz polimérica extracelular representa cerca de 90%, enquanto o microrganismo em si corresponde por menos de 10% de massa seca (Flemming & Wingender, 2010).

Basicamente, para a formação do biofilme há um abandono na condição móvel, ou seja, na fase em que as células se encontram solitárias, também conhecida como fase planctônica, e a formação de um novo arranjo estrutural se inicia a partir das células planctônicas que se depositam sobre uma determinada superfície. Estruturalmente, a formação do biofilme fúngico filamentoso envolve seis fases (Figura 4), sendo que a etapa I é a fase inicial e reversível, onde os conídios ou fragmentos de hifas se depositam e estabelecem contato físico com a superfície (Harding et al. 2009).

O início da fixação é mediado por fatores não específicos como a hidrofobicidade de componentes estruturais da parede celular, como por exemplo as hidrofobinas que são proteínas que estabilizam a adesão dos conídios e hifas para superfícies bióticas e abióticas, e também é mediado por forças eletrostáticas, cuja interação entre os componentes estruturais da parede celular do fungo e a superfície biótica ou abiótica geram uma força de atração fraca e, portanto, reversível (Ramage et al. 2009; Gonzáles- Ramírez et al. 2016, Córdova-Alcantara et al. 2019).

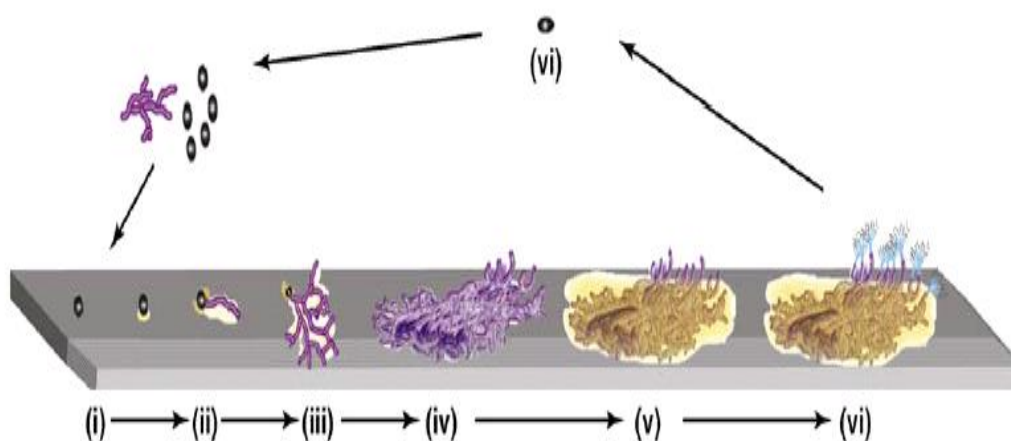


Figura 4. Fases de formação de biofilme de fungo filamentoso. Fase I: Adsorção de propágulo. Fase II: Fixação ativa a superfície. Fase III: Formação de microcolônias. Fase IV: Maturação inicial. Fase V: Biofilme maduro e desenvolvimento reprodutivo. Fase VI: Dispersão ou fase planctônica (Fonte: Harding et al. 2009).

Por outro lado, a etapa II é a fase de fixação, nesse período, o microrganismo secreta substâncias adesinas produzidas pelos conídios em germinação, que irão aderir-lo fortemente ao local (Harding et al. 2009). A partir de então, inicia-se um tipo de ligação irreversível e permanente, onde as adesinas presentes na superfície, se ligam ao substrato, à matriz polimérica extracelular e às demais células presentes no biofilme (Gonzáles- Ramírez et al. 2016). Para tanto, há o envolvimento de genes que as codificam, por exemplo, *C. albicans* produz adesinas que se ligam a ligantes como fibrinogênio e fibronectina (Córdova-Alcantara et al. 2019).

A etapa III, por sua vez, inicia-se com a formação de microcolônias, nesse momento, ocorre o alongamento apical e ramificação das hifas com formação de

monocamada, além da extensa produção de matriz polimérica extracelular (Harding et al. 2009). Enquanto a etapa IV, é caracterizada pela formação de várias redes de hifas compactadas entre si, e pela formação de canais de água que ocorrem através da repulsão hidrofóbica entre as hifas. Por outro lado, a fase V está relacionada a maturação do biofilme, onde há desenvolvimento reprodutivo, com formação de corpos de frutificação e células conidiogênicas. Por fim, a etapa VI envolve a dispersão dos conídios que irão reiniciar um novo ciclo (Harding et al., 2009).

Em termos de tempo de formação de biofilme, em *F. solani* ficou comprovado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que desde o momento em que os conídios se depositam sobre uma superfície até a maturação do biofilme e liberação de novas células planctônicas, há um período de 72 horas. Em 4h ocorre a adesão celular e coagregação celular, em 8h a germinação dos conídios, alongamento e desenvolvimento das hifas, em 12h o entrelaçamento das hifas e início da formação de canais de água. Entre 24-48h, o biofilme já apresenta sinais de maturação com hifas bem desenvolvidas e entrelaçadas entre si, além de canais de água formados e abundante matriz polimérica extracelular. Por outro lado, em 72h o biofilme está completamente maduro e apresentando descolamento celular (Figura 5) (Córdova-Alcántara et al., 2019).

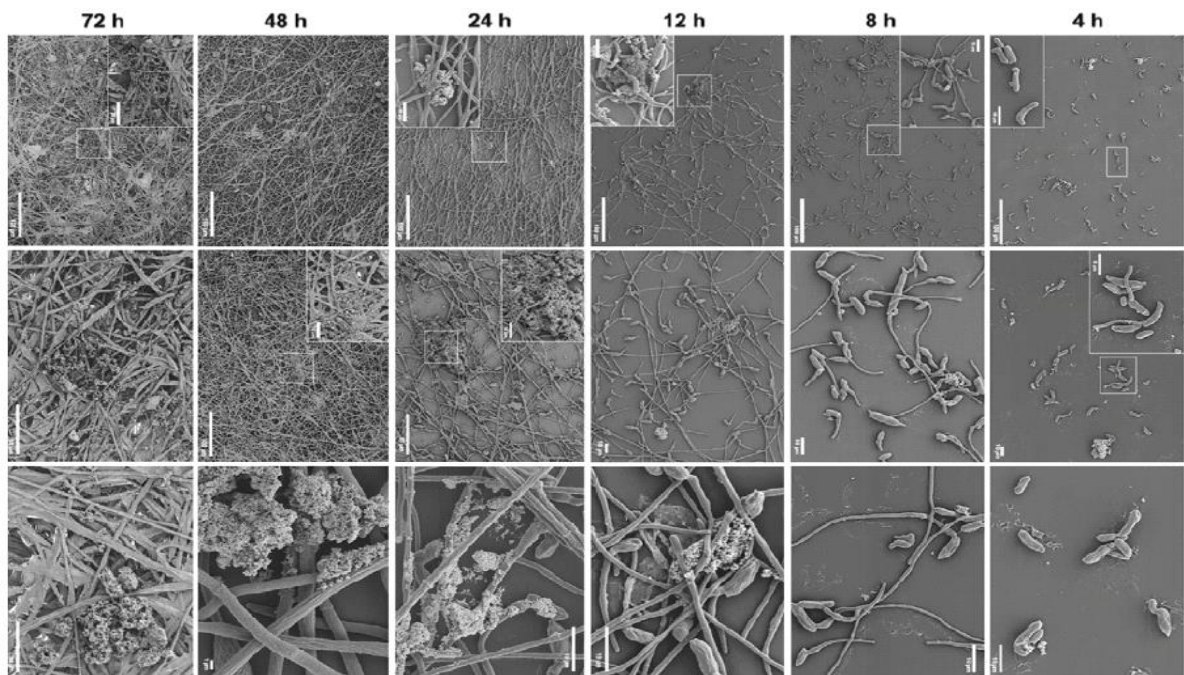


Figura 5. Estágios de desenvolvimento de biofilme de *Fusarium solani* por microscopia eletrônica de varredura. Tempos de formação do biofilme. 0 - 4h: Adesão celular e coagregação; 8h: Germinação; 12h: Extensão das hifas e formação de canais de água; 24h – 48h: Biofilme com sinais de maturação; 72h: Biofilme maduro com possível liberação de células sésseis (Fonte: Córdova-Alcántara et al., 2019).

Outros gêneros fúngicos como *Trichophyton* e *Microsporium* também têm sido relacionados a formação de biofilme (Costa-Orlandi et al., 2014; Danielli et al., 2017). Inclusive, Brilhante et al. (2017) relatam que o potencial de formação de biofilme por parte dos dermatófitos pode explicar a presença de elementos fúngicos vivos como hifas e arthroconídios fortemente aderidos a lâmina ungueal, por exemplo. Costa-Orlandi et al. (2014) observaram que o biofilme de *T. rubrum* também passou por um período de maturação de 72h. Diante do exposto, vários estudos têm comprovado a capacidade de fungos filamentosos formarem biofilme. Sendo assim, tanto na clínica médica humana como animal, os biofilmes de fungos filamentosos são a forma infectiva primária no processo de patogenia (Costa-Orlandi et al., 2014). E, embora a arquitetura dos biofilmes filamentosos seja diferente quando comparado ao biofilme leveduriforme, a presença de várias camadas de hifas entrelaçadas e matriz extracelular tornam o biofilme uma importante forma de virulência e de

desenvolvimento de resistência contra fármacos antimicrobianos (Harding et al., 2009).

3.4.1 Onicomicose por biofilmes de *Fusarium* spp. e *T. rubrum*

O termo onicomicose, é derivado do grego “ônix” que significa unha e “mykes” fungo (Leung et al., 2020). Refere-se a uma infecção fúngica na lâmina ungueal que pode ocasionar dor, parestesias, descolamento, descoloração e espessamento que resultam em prejuízos às atividades diárias e as interações sociais, além disso, dependendo a gravidade da onicomicose se faz necessária a remoção da placa ungueal (Gupta et al., 2016; Lipner et al. 2019).

Os fungos podem afetar as unhas das mãos ou dos pés, sendo a infecção nas unhas dos pés a mais frequente (Cengiz et al., 2017). Com uma prevalência mundial de 18%, entre os adultos, os idosos são os mais afetados com aproximadamente 20% dos casos (Lipner et al. 2019). A alta prevalência entre os idosos está relacionada ao menor crescimento das unhas, pouca circulação sanguínea nos membros inferiores, imunossupressão relacionada à idade, e incapacidade de higienização adequada da região (Diongue et al., 2017). Obviamente que além da idade avançada, outros fatores de risco estão envolvidos no desenvolvimento de onicomicose entre os adultos, como por exemplo, traumas nas unhas que podem ocorrer em indivíduos imunocompetentes ou jovens, comorbidades como diabetes ou obesidade (Lipner et al. 2019). Entre membros de uma mesma casa, a onicomicose pode ser comum, uma vez que é considerada uma doença hereditária, e o risco de transmissão para outros membros da família quando um familiar é afetado é de 44 a 47% (Ghannoum et al., 2013).

T. rubrum está entre os principais fungos envolvidos nesse tipo de patologia clínica sendo responsável por cerca de 60 a 70% das infecções, enquanto *Fusarium* spp. representa 20% (Lipner et al. 2019). Na lâmina ungueal, o dermatófito não gera dor, enquanto o não-dermatófito ocasiona dor, além de paroníquia e coceira (Galetti et al., 2015; Yue et al., 2015; Veiga et al., 2018). Quando a onicomicose é relacionada à *T. rubrum* variações na coloração da unha são encontradas, como por exemplo, amarelo claro, branco, ou cinza escuro, o acúmulo de detritos subungueais e irregularidades também estão presentes (Yue et al., 2015). Por outro lado, quando *Fusarium* está envolvido, as unhas apresentam uma coloração branco amarelada, onicólise e rugosidade (Rosa et al., 2016). Além disso, nas unhas são detectadas hifas

septadas, hialinas, clamidósporos e microconídios (Galletti et al., 2015). Dentre as espécies envolvidas, *F. oxyporum*, *F. solani* e *F. keratoplasticum* são os principais agentes etiológicos (Rosa et al., 2017; Toukabri et al., 2017). Todavia, quando afetadas por *T. rubrum*, as hifas são hialinas mas não encontram-se ramificadas e a presença de microconídios também é visível na amostra clínica (Yue et al., 2015) (Figura 6).

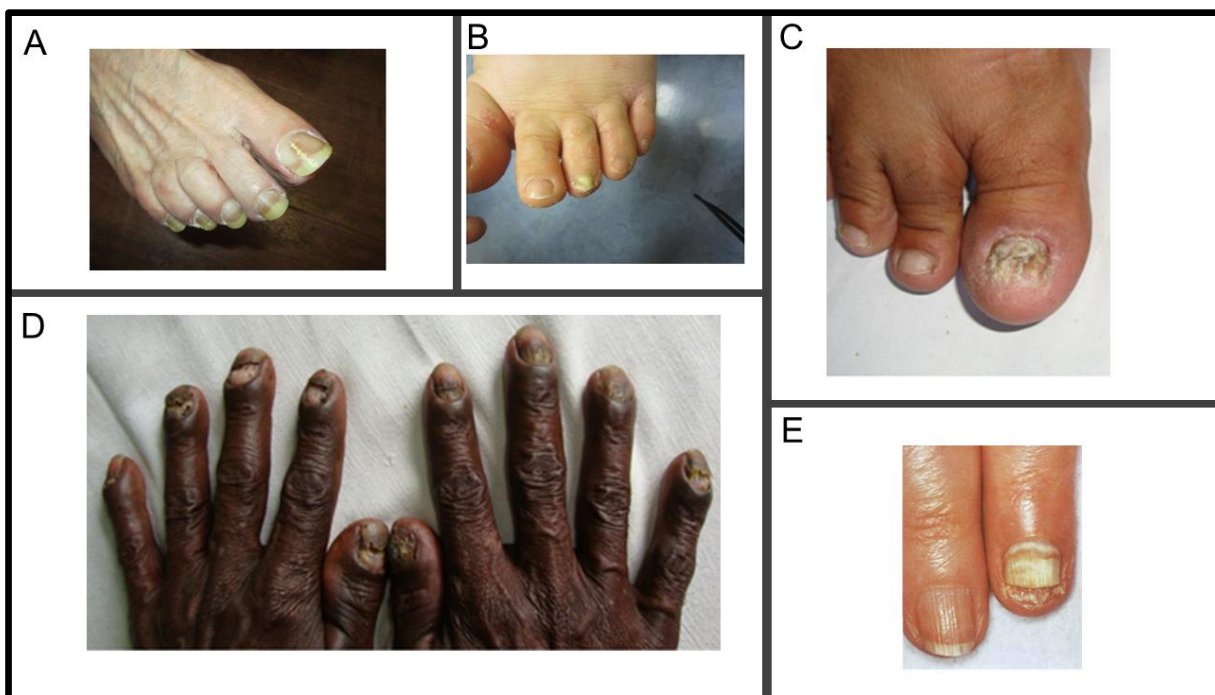


Figura 6. Onicomicose por *T. rubrum* e *Fusarium*. A) Dermatofitoma. B) Onicomicose por *T. rubrum* cobrindo parcialmente a lâmina ungueal. C-D) Unhas distróficas com presença de paroníquia. E) Leuconíquia (manchas branco-amareladas) e rugosidade na lâmina ungueal. Fonte: Baran et al. (1997); Ranawaka et al. (2015); Leung et al. (2020).

Na lâmina ungueal, esses dois agentes têm a capacidade de infectar e formar biofilme, tal característica deve-se ao fato deles degradarem a queratina e por isso a alta incidência desses microrganismos na unha (Nusbaum et al., 2012; Vila et al., 2015). Brilhante et al. (2016), avaliaram a capacidade de *T. rubrum* formar biofilme *in vitro* e *ex vivo*, os autores observaram por MEV grande quantidade de biomassa sobre fragmentos de unhas humanas e relacionaram os achados às características

antropofílicas da espécie que tem alta adaptabilidade aos tecidos do hospedeiro. Em contrapartida, *in vitro* De Chaves et al. (2020) constatou a forte formação de biofilme pelas principais espécies de *Fusarium* envolvidas em casos de onicomicose (*F. solani*, *F. keratoplasticum* e *F. oxysporum*). Enquanto Veiga et al. (2018) comprovou a capacidade de formação de biofilme por *F. oxysporum* nas lâminas ungueais humanas.

Para que o processo de invasão ungueal aconteça, *T. rubrum* coloniza a superfície ventral da unha, enquanto *Fusarium* spp. coloniza tanto a superfície ventral quanto a dorsal, embora tenha preferência pela ventral (Veiga et al., 2018). Em *F. oxysporum*, entre 7 dias após o contato dos conídios com a lâmina ungueal o biofilme está formado, sendo o primeiro, quarto e sétimo dia cruciais para o estabelecimento do biofilme. Nesse período, ocorre a transição da forma conidial para hifas nos primeiros dois dias de infecção, enquanto no sexto dia, grande quantidade de hifas organizadas e com matriz polimérica extracelular são observadas (Veiga et al., 2021).

Obviamente, para que a infecção e biofilme em si sejam estabelecidos várias interações ocorrem entre o fungo e a unha. Em *T. rubrum*, a aderência das células conidiais ocorre em um período de 3 a 4 horas, para tanto, na superfície do microconídio são secretas proteínas do tipo adesinas que se aderem a carboidratos presentes na superfície das células do hospedeiro (Costa-Orlandi et al., 2014). No entanto, para que a adesão se inicie, fibrilas curtas e longas são produzidas pelo microconídio e que se estendem ao longo da superfície impedindo a desconexão do elemento fúngico (Baldo et al., 2012). Uma vez aderidos, começa o processo de extensão e prolongamento das hifas, que nesse caso penetram o tecido queratinizado (Veiga et al., 2018).

Nesse período, enzimas do tipo endo e exoproteases são secretadas com a finalidade de degradar a queratina. Esta por sua vez é quebrada em grandes peptídeos que posteriormente serão quebrados em aminoácidos e peptídeos curtos (Baldo et al., 2012). Com a aderência e a extensão das hifas em todas as direções, grande quantidade de matriz polimérica extracelular é encontrada em um biofilme e que representa a proteção necessária para a manutenção do biofilme no local (Brilhante et al., 2017). Uma vez estabelecido o biofilme, o diagnóstico micológico para a confirmação do fungo envolvido, contempla a coleta da amostra no laboratório clínico seguido pela observação das estruturas fúngicas no material e identificação do microrganismo por cultura (Baran, 2019; Gupta et al., 2020).

3.4.2 Ceratite por biofilme de *Fusarium* spp. e forma de combate

A ceratite por *Fusarium* spp. é uma infecção ocular severa que acomete a córnea e ocorre quando ela é submetida a algum tipo de trauma, cirurgia ou pela exposição à lentes de contato contaminadas com o microrganismo (Boucier et al., 2017). Por ser extremamente agressiva, é a causa comum de cegueira monocular em países tropicais e subtropicais (Szaliński et al., 2021). Durante a época de colheita, a incidência de trabalhadores rurais que contaminam suas córneas através de uma lesão aumenta, por outro lado, quando associada ao uso de lentes de contato, o risco de contaminação é ainda maior do que na agricultura (Chen et al., 2006). Estima-se que nos EUA mais de 50 milhões de pessoas são usuárias de lentes de contato e em uma estimativa mundial, aproximadamente 150 milhões. As lentes de contato são amplamente utilizadas para corrigir diferentes tipos de erros de refração e como já mencionado, podem ser fonte de infecção (Khan et al., 2021).

Dentre os fatores de risco para a contaminação da córnea, estão o uso prolongado de lentes gelatinosas, uso noturno e baixa adesão à lentes recomendadas, além de falta de cuidados com o armazenamento e manuseio da lente. Esses fatores contribuem para que o risco de desenvolvimento de ceratite aumente cerca de 80 vezes entre os usuários de lentes de contato quando comparado a não usuários saudáveis (Chang et al., 2006). Além disso, o estudo de Stapleton et al., (2012) demonstrou que entre os fatores de risco para o desenvolvimento de ceratite moderada e grave estão a falta de higiene e a substituição infrequente dos estojos de armazenamento das lentes.

Em março de 2006, o CDC (Centro para o controle de doenças e prevenção) recebeu 318 relatos de ceratite por *Fusarium* em indivíduos usuários de lentes de contato nos EUA. Destes, 55 foram encaminhados para o transplante de córnea por complicações ocasionadas pelo microrganismo na região ocular, outros tiveram que se submeter à remoção do olho. O que ambos os pacientes tinham em comum era o uso de uma solução de armazenamento para lentes de contato conhecida como ReNu Multiplus, quando a solução foi retirada do mercado em 2006, o número de pacientes declinou ao nível normal em junho do mesmo ano (Chang et al., 2006).

Na córnea, a lente de contato modifica o epitélio da córnea, além de carregar o microrganismo para a superfície ocular. De acordo com Sousha et al. (2013), as lentes de contato causam brechas nos mecanismos protetores locais do olho e dessa

maneira, ocasionam o comprometimento do metabolismo e integridade da córnea, diminuem a espessura epitelial e a taxa metabólica, além de causar o afinamento do estroma, vermelhidão, vascularização, entre outros. Quando ocorre um dano à córnea, a pouca interação entre o cristalino e o epitélio da córnea induz alterações locais causando hipóxia e hipercapnia, que prejudicam o epitélio de tal forma que ele não responde ao dano, com isso, a troca do fluido lacrimal é afetada entre os lados posterior e anterior do cristalino, alterando a composição do fluido lacrimal na superfície ocular e limitando as propriedades antimicrobianas (Bispo et al., 2015).

Cabe ressaltar que os fungos somente causam ceratite quando há arranhaduras na córnea, o estudo de Sousha et al. (2013), demonstrou que lentes de contato infectadas com *Fusarium* somente causaram infecções em ratos quando a córnea foi raspada e o estroma foi exposto, sugerindo inclusive que as células de reconhecimento inicial de *Fusarium* estão localizadas no estroma. No que tange à resposta imunológica do hospedeiro, acredita-se que um curso grave de infecção por *Fusarium* seja proveniente da resposta imune, pois as cepas de *Fusarium* induzem a ativação de macrófagos, infiltração por leucócitos polimorfonucleares e o aumento dos níveis de citocinas, que desencadeiam uma forte opacificação da córnea, resultando no comprometimento da resposta tecidual e conseqüentemente o crescimento descontrolado do microrganismo que perfura a córnea (Sousha et al., 2013; Szaliński et al., 2021).

Quando comparada a ceratite bacteriana, a ceratite fúngica apresenta o pior prognóstico, pois na maioria dos casos, o diagnóstico é tardio e a dificuldade de tratamento eleva a probabilidade de afetar a integridade do globo, estendendo-se a infecção até a câmara anterior do olho (Sousha et al., 2013). O diagnóstico de ceratite por *Fusarium* envolve a realização de esfregaços, culturas, além de microscopia confocal de varredura e PCR (reação em cadeia da polimerase), embora os dois primeiros testes sejam considerados o padrão-ouro (Mahmoudi et al., 2018). Dentre os sintomas ocasionados pela presença do fungo na região ocular, estão a inflamação, dor, eritema conjuntival, visão reduzida ou até mesmo perda da visão (Al-Hatmi et al., 2018).

Durante o exame físico serão detectados hiperemia conjuntival, além de infiltrado corneano branco ou creme (lesões satélites) que resultam em opacidade da córnea, além de irregularidades na córnea (80%), úlcera, bordas elevadas e crescimento em extensão e profundidade (Figura 7). Os sinais clínicos podem ser

visualizados com a utilização de uma lanterna com ou sem lupas, auxiliada por filtro azul e tiras de teste de fluoresceína. Também pode ser utilizado biomicroscópio de lâmpada de fenda, que produz sinais mais sutis e que permite ajudar na diferenciação entre os agentes causadores de ceratite. Além disso, quando se trata de ceratite fúngica a cor é diferente do amarelo, as margens da córnea são serrilhadas e tem-se tecido epitelial morto no local (Hoffman et al., 2021).

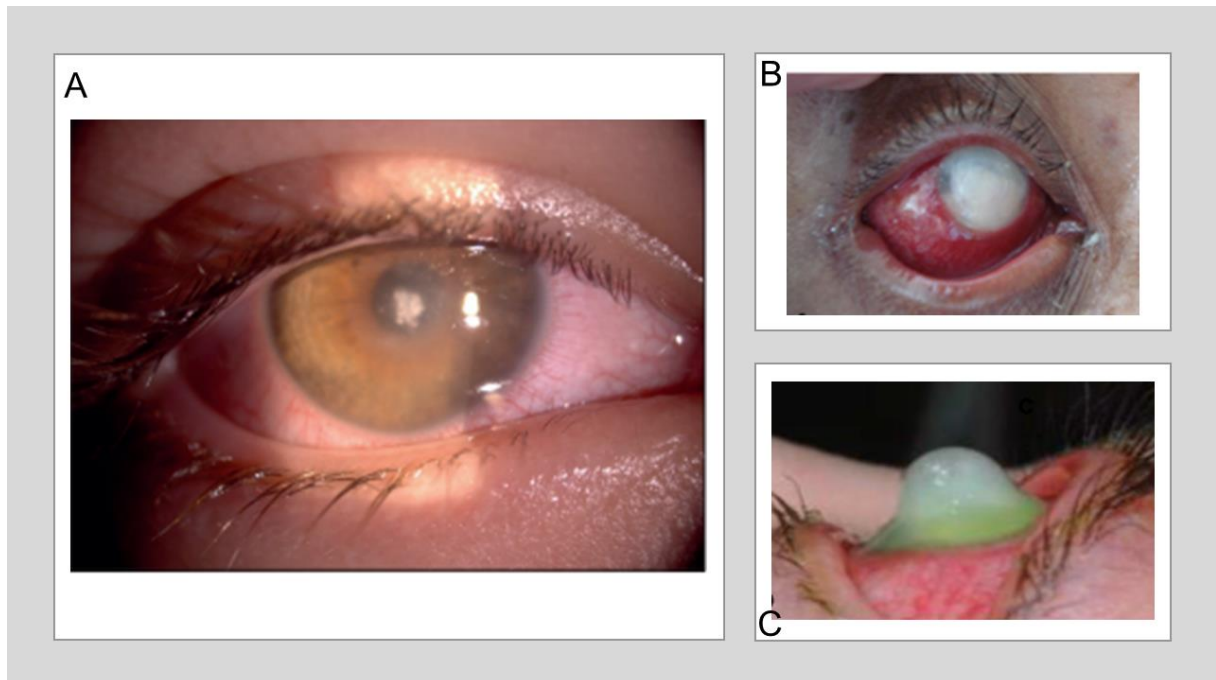


Figura 7. Ceratite por *Fusarium* spp.. A) Abscesso na córnea. B) Úlcera com envolvimento da esclera. C) Desmetocele da córnea. Al-Hatmi et al. (2014); Bernal et al. (2015); Amadasi et al. (2017).

Entre as espécies envolvidas nesse tipo de infecção, o complexo de espécies de *F. solani* e de *F. oxysporum* são os principais complexos relacionados. Contudo, ao comparar os dois complexos em casos de ceratite, o FGSC prevalece, pois em um estudo na Alemanha, as espécies que compõem o FGSC foram os principais agentes etiológicos envolvidos na maioria dos casos clínicos relacionados a ceratite por *Fusarium*, assim como em outros países como Tunísia, Índia e México (Vanzini Zago et al., 2010; Homa et al., 2013; Cheikhrouhou et al., 2014; Walther et al., 2017). No entanto, independente do complexo, da mesma forma que na lâmina ungueal, esses

microrganismos formam biofilme e várias são as interações estabelecidas entre eles que garantem a adesão e invasão na córnea, dentre elas algumas enzimas como proteases, proteínas quinases, proteínas multifuncionais e collagenases (Córdova-Alvantara et al., 2019). Uma vez estabelecido, o biofilme é considerado um fator chave para a patogenicidade do *Fusarium* e contribui para a resistência aos antifúngicos (Szaliński et al., 2021).

3.4.3 Tinea capitis por biofilme de *M. canis*

A tinea capitis é uma infecção do folículo piloso no couro cabeludo e na pele circundante. A infecção é diagnosticada pela presença de erupções cutâneas no couro cabeludo, manchas eritematosas escamosas com crostas espessas de coloração amarelo-acinzentadas, manchas de alopecia, presença de cabelos quebrados e formação de cicatrizes graves (Figura 8) (Zhi et al., 2020; Yang et al., 2021). É um tipo de infecção que acomete principalmente crianças em idade escolar, e está relacionada ao contato direto com animais, contudo, a transmissão pode ocorrer de pessoa para pessoa ou por fômites contaminados (Xiao et al., 2021).

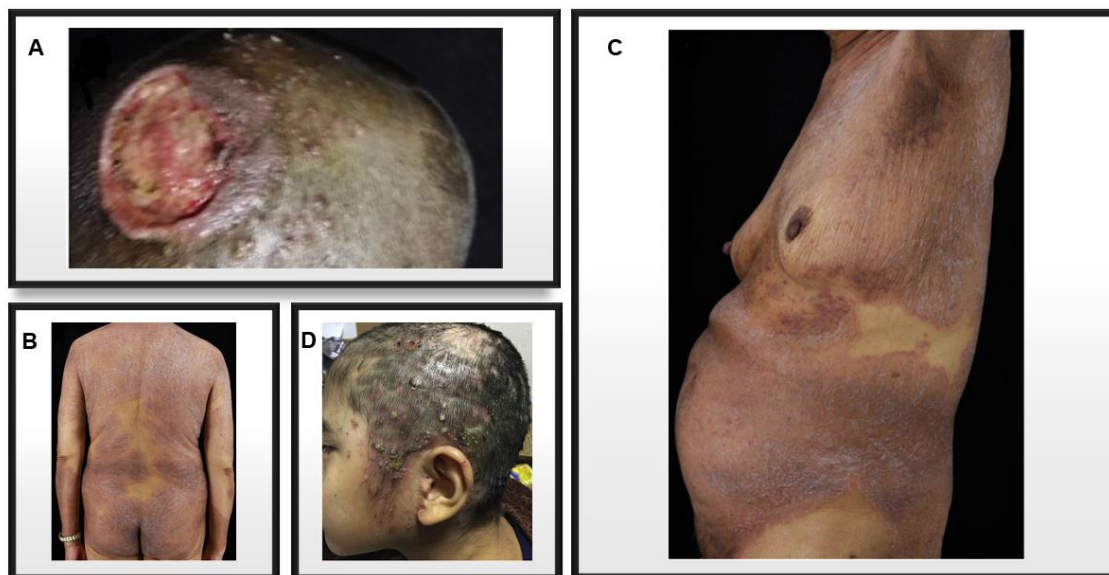


Figura 8. Infecção por *M. canis* em diferentes regiões anatômicas. A) Lesão do couro cabeludo do tipo kerion por *M. canis* e *T. mentagrophytes* em associação. B–C) Lesão corporal por *M. canis* em adulta idosa. D) Lesão por *M. canis* do tipo kerion. (Fonte: Nakagawa et al., 2018; Yang et al., 2020; Yang et al., 2021).

Em adultos ela é incomum, e tal característica deve-se às alterações de pH e aumento de ácidos graxos no couro cabeludo adulto. No entanto, em mulheres idosas, em períodos pós-menstruais e que apresentam redução na produção de sebo fungistático a infecção tem sido frequente (Yang et al., 2021). O que tem colocado em evidência a tinea capitis em adultos idosos é a presença de alguma doença adjacente, como por exemplo infecção por HIV ou doenças crônicas sistêmicas como diabetes mellitus (Yang et al., 2021).

Entre os dermatófitos, *M. canis* é um dos agentes mais frequentes nesse tipo de acometimento e é encontrado principalmente na Europa, América do Sul e China (Yang et al., 2020; Xiao et al., 2021). No estudo de Zhi et al. (2020), *M. canis* foi o patógeno mais isolado de casos de tinea capitis em crianças, representando cerca de 38,5% dos casos (250 de 650 casos), seguido de *T. mentagrophytes*, *T. violaceum* e *T. tonsurans*. Segundo os autores, a infecção tem prevalência mundial e o espectro do patógeno depende de variações geográficas, assim como idade, sexo, estado geral de saúde, além da condição socioeconômica das populações afetadas.

Recentemente, foi relatado uma infecção do couro cabeludo do tipo Kerion (forma inflamatória grave que gera reações de hipersensibilidade), cujos agentes envolvidos foram *M. canis* e *T. mentagrophytes*. A infecção foi detectada em um menino de cinco anos de idade que apresentou uma grande úlcera acompanhada de pústulas foliculares circundantes no couro cabeludo, a evolução foi rápida, duas semanas antes, as lesões eram caracterizadas como pústulas foliculares pruriginosas que aumentaram gradativamente formando um abscesso e tiveram início a partir de arranhões no couro cabeludo. Acredita-se que a origem da infecção foi o contato com animais como gato e coelho, uma vez que a residência do menino era na zona rural (Yang et al., 2020).

O diagnóstico em si para a detecção de *M. canis* no cabelo e couro cabeludo, envolve a utilização de lâmpada de wood que emite fluorescência verde brilhante sobre a área afetada, também são detectados no exame físico, fragmentos quebradiços de cabelo em formato de vírgula, saca-rolhas, zig-zague e código Morse. Embora a utilização de fluorescência já seja um indicativo, o padrão-ouro do diagnóstico micológico contempla o exame microscópico direto e a cultura fúngica (Yang et al., 2021). Alguns estudos relacionam a tinea capitis por *M. canis* à biofilmes, por exemplo Danielli et al. (2017) verificou por MEV a presença de extensa matriz

polimérica extracelular circundando a rede de hifas de *M. canis*. Por outro lado, Abdel-Aziz et al. (2020) confirmou a capacidade de *M. canis* formar biofilme sobre fragmentos de cabelos.

3.5. Terapia antifúngica contra micoses superficiais, mecanismos de ação dos antifúngicos e dosagens recomendadas

O arsenal terapêutico é composto por aproximadamente 40 agentes antifúngicos, destes, apenas três (natamicina, voriconazol e anfotericina B) são utilizados como primeira linha para o tratamento de ceratite por *Fusarium*. No que tange ao tratamento, ele pode ser realizado topicamente e é utilizado como primeira linha com dosagem intensiva de hora em hora nas primeiras 48 h, nesse caso, a natamina 5% é opção escolhida. Além disso, também pode ser por via oral ou intravenosa, subconjuntival, estromal corneana ou injeção intracamerar. No entanto, quando se opta pela aplicação tópica, os antifúngicos atuais não são eficazes e a infecção pode progredir apesar do tratamento, resultando na perfuração da córnea ou até mesmo na perda total do globo ocular e para que isso não ocorra, uma das opções é a terapia cirúrgica onde a córnea doente será removida e substituída por tecido corneano doado, contudo, a ceratoplastia é reservada para casos em que a infecção é refratária ao tratamento ou então pela perfuração da córnea (Hoffman et al., 2021).

No caso de onicomicose por esse microrganismo, as opções terapêuticas ainda são mais restritas e concentram-se na utilização de itraconazol oral e por ser um tratamento empírico, não surte efeito, já que é confirmado pela comunidade científica que o itraconazol não é ativo contra *Fusarium* spp. (Rosa et al., 2018; Szaliński et al., 2021). Por outro lado, a terbinafina e o ciclopirox olamina são recomendados como antifúngicos tópicos a serem aplicados na lâmina ungueal (Leung et al., 2020). Todavia, quando se trata de onicomicose por dermatófitos como *T. rubrum*, o tratamento oral envolve a utilização de terbinafina e itraconazol, enquanto o tópico a aplicação de esmaltes ou soluções para unhas com os antifúngicos ciclopirox olamina (8%), amorolfina (5%) e terbinafina (8%) (Leung et al., 2020). A adoção de antifúngicos orais para o combate da onicomicose é efetuada quando há o comprometimento de mais de 50% da lâmina ungueal, também quando várias unhas são afetadas, a matriz ungueal está envolvida ou em casos de dermatofitoma (uma infecção mais severa e relacionada à biofilme).

Por outro lado, a aplicação de antifúngicos tópicos na unha é utilizada quando a onicomicose é considerada leve a moderada, ou seja, quando menos de 50% da unha foi afetada, não houve o envolvimento da matriz ungueal e menos de 3 unhas foram infectadas. Todavia, quando se refere ao tratamento de tinea capitis, o combate à infecção geralmente envolve a utilização de antifúngicos orais, já que os antifúngicos tópicos são incapazes de penetrar suficientemente na haste do cabelo e eliminar a infecção. Em um contexto geral, griseofulvina, terbinafina, cetoconazol, fluconazol e itraconazol são os antifúngicos mais utilizados (Xiao et al., 2021).

Os compostos que são atualmente utilizados na clínica médica para o combate das infecções fúngicas são divididos dentro de classes e de acordo com o mecanismo de ação de cada um deles, por exemplo, são responsáveis por inibir a biossíntese da parede celular, interferir no metabolismo do ergosterol ou das pirimidinas, inibem a biossíntese dos microtúbulos ou então quelam íons (Hokken et al., 2019). Os azóis são classificados em dois grupos, imidazóis (cotrimazol, miconazol e cetoconazol) e triazóis (fluconazol e itraconazol, voriconazol e posaconazol), ambos inibem a enzima lanosterol 14 α -demetilase e impedem o lanosterol de ser convertido em ergosterol, resultando no acúmulo de esteróis 14-metilados dentro da célula. Por outro lado, as alilaminas possuem um forte representante que é a terbinafina, que também atua sobre a biossíntese de ergosterol, contudo inibe a enzima esqualeno epoxidase e impedem ela de catalisar a conversão de esqualeno a 2,3-esqualeno epoxidase, com isso, há o acúmulo de esqualeno na célula e dessa forma ocorre a ruptura dela (Campoy & Adrio, 2017).

Os polienos por sua vez, se ligam ao ergosterol e perturbam a integridade da membrana causando desequilíbrio osmótico e extravasamento celular, enquanto o ciclopirox um antifúngico da classe das hidroxipiridona atua na quelação de íons metálicos trivalentes, por outro lado, a amorolfina, uma morfolina atua sobre a rota de biossíntese do ergosterol nas enzimas 14 Δ -redutase e 7 Δ -8 Δ isomerase, enquanto griseofulvina se liga aos microtúbulos e interfere na montagem dos microtúbulos inibindo a mitose (Tauber & Muller-Goymann, 2014; Campoy & Adrio, 2017; Hokken et al., 2019).

3.6 Resistência aos antifúngicos na forma planctônica e de biofilme

Não são poucas as dificuldades que os antifúngicos encontram ou apresentam até alcançarem o alvo, por exemplo, a natamicina é uma molécula grande e não

permeia a córnea, a anfotericina B apresenta vários efeitos colaterais e é considerada nefrotóxica, o voriconazol é caríssimo, e como já mencionado o itraconazol não tem atividade contra *Fusarium*. Na lâmina ungueal os antifúngicos encontram muita dificuldade de permeação, assim como no cabelo, sendo assim já encontram várias limitações para eliminar as doenças fúngicas.

Aliado a isso, esses mesmos microrganismos têm se tornado resistente a maioria dos agentes antifúngicos prescritos, ou então carregam no seu DNA genes que conferem resistência aos agentes antifúngicos (Gupta & Venkataraman, 2021). Esse é o caso de *Fusarium* spp., que é intrinsecamente resistente aos azóis, cuja resistência deve-se a presença de três genes parálogos (CYP51A, B e C), sendo o clado C responsável pela resistência específica ao fluconazol (FAN et al., 2013). *Fusarium* spp. também têm exibido resistência intrínseca as equinocandinas, e dessa forma, é atualmente considerado pela clínica médica um dos fungos mais resistentes e, portanto, um problema de saúde pública (Taj-Aldeen, 2017). De acordo com Tortorano et al. (2014), o tratamento ideal para casos de fusariose envolve a utilização de anfotericina B, voriconazol e natamicina, contudo, Taj-Aldeen et al. (2016) relataram espécies de *Fusarium* resistentes ao voriconazol e anfotericina.

Dentre os mecanismos que os fungos têm exibido e que tornam a utilização dos antifúngicos inválida, têm-se as alterações no alvo do fármaco que incluem mutações pontuais e a super expressão de genes alvo, quando as mutações estão envolvidas, elas são responsáveis por diminuir a capacidade do antifúngico se ligar ao alvo e, portanto, enfraquecem os efeitos do fármaco. Por outro lado, o aumento na expressão de genes requer um nível mais elevado de fármaco para atingir o efeito antifúngico, além disso, as bombas de efluxo e os biofilmes são grandes aliados na luta pela sobrevivência do microrganismo (Zhao et al., 2021).

Dermatófitos com sensibilidade reduzida aos agentes antifúngicos têm sido encontrados em diferentes regiões do mundo. Na Suíça por exemplo, 17 isolados clínicos de *T. rubrum* exibiram resistência a terbinafina por mutações pontuais no gene que codifica a enzima esqualeno epoxidase (envolvida no passo inicial do caminho de biossíntese do ergosterol) (Monod et al., 2019). Por outro lado, foi relatado que a expressão elevada do gene salicylato 1-monooxygenase aumentou a resistência a terbinafina em *T. rubrum*, o estudo inclusive apresentou uma outra via de resistência, já que as mutações pontuais no gene que codifica a enzima esqualeno epoxidase são as principais responsáveis pela resistência ao antifúngico (Santos et al., 2018).

O estudo de Monod et al. (2019) demonstrou que a resistência aos azóis por *T. rubrum* é mediada pela expressão de bombas de efluxo, especialmente a família de transportadores ABC, no microrganismo foram encontrados quatro transportadores, TruMDR1, TruMDR2, TruMDR3 e TruMDR5, sendo que o TruMDR3 foi capaz de transportar cinco azóis. Em *M. canis* a resistência a terbinafina também está vinculada ao transporte por bombas de efluxo, e nesse caso envolveu os transportadores PDR1, MDR1, MDR2 e MDR4 (Kano et al., 2018).

Quando o microrganismo está na forma sésil, vários são os mecanismos que estão envolvidos e que conferem resistência no biofilme, dentre eles estão o aumento na expressão de bombas de efluxo, produção de matriz polimérica extracelular, quiescência metabólica e sistema imune do hospedeiro (Mukherjee et al., 2003). Além disso, diversas mudanças genéticas acontecem no biofilme, junto com a expressão de proteínas que levam a filamentação e que favorecem a resistência (Borghetti et al., 2017; Danielli et al., 2017; Brilhante et al., 2019, Zhao et al., 2021).

Por exemplo, durante o processo de adesão e/ou início da formação do biofilme, tipicamente as bombas de efluxo desempenham um papel fundamental na resistência fúngica, pois têm sua atividade potencializada na fase inicial de formação do biofilme, ou seja, quando a matriz ainda não foi totalmente produzida, as bombas são responsáveis por expulsar o antifúngico da célula e, portanto, conferem resistência (Mukherjee et al., 2003). Por outro lado, quando a matriz polimérica extracelular já está estabelecida, ela protege as células fúngicas dos antifúngicos levando ao desenvolvimento de células tolerantes, assim como resistência, já que a permeação do agente é reduzida, além disso, a matriz também protege contra as células do sistema imunológico, pois em biofilmes *in vivo*, o sistema imunológico age em conjunto com o antifúngico para erradicar a infecção (La Fleur et al., 2006; Wuyts et al., 2018).

Em concomitância, no biofilme maduro a expressão de genes que expressam o ergosterol é diminuída, assim como o conteúdo de ergosterol em si, e tais características podem contribuir para a resistência, já que os azóis e os polienos têm preferência sobre esse alvo (La Fleur et al., 2006). Sendo assim, as infecções fúngicas podem não responder ao tratamento e esse resultado deve-se principalmente ao estilo de vida que adotam, pois, estima-se que a concentração de antifúngicos necessária para erradicar um biofilme é aproximadamente 1000 vezes maior do que a

concentração necessária para erradicar as células planctônicas (Kowalski et al., 2020; Wille & Coenye, 2020).

3.7 Estratégias para o combate de infecções fúngicas

Para que um novo medicamento seja desenvolvido e liberado para comercialização, estima-se que o gasto médio antes dos impostos é de aproximadamente 2,558 bilhões de dólares e leva cerca de 10 a 15 anos, portanto, devido as várias dificuldades inerentes ao processo de desenvolvimento assim como o tempo demandado, outras estratégias são adotadas para o combate de doenças, assim como as doenças fúngicas. Dentre elas têm-se o reposicionamento de medicamentos já existentes no mercado, este por sua vez, baseia-se no redirecionamento do fármaco para uma nova indicação (Pippi et al., 2017; Fuchs et al., 2021).

Notavelmente, a história da medicina foi marcada por muitos exemplos de medicamentos que foram reposicionados, alguns inclusive muito antigos, e dentre os fármacos que foram reposicionados têm-se aqueles que falharam na fase clínica de seu desenvolvimento por conta de sua toxicidade, eficácia ineficiente ou aqueles que foram retirados do mercado por questões de segurança (Jourdan et al., 2020). Embora se tenham pontos negativos, há aqueles que já foram considerados suficientemente seguros em modelos pré-clínicos e em humanos, portanto o risco de falha é menor quando comparado a um fármaco novo por exemplo, também o prazo de desenvolvimento é reduzido, além de revelar novos alvos que podem ser mais explorados (Pushpakom et al., 2019).

Dentre os fármacos que já foram retirados do mercado, têm-se o clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina), um derivado da 8-hidroxiquinolina que foi amplamente utilizado como antiparasitário para o tratamento e prevenção de amebíase intestinal nas décadas de 50 a 70. Contudo, nos anos 70 as soluções orais foram removidas do mercado devido a relatos de neurotoxicidade em japoneses, sendo considerado inclusive o agente causador da neuropatia mielo-óptica aguda, uma síndrome responsável pelo aparecimento subagudo de distúrbios sensoriais motores dos membros inferiores e comprometimento visual. O quadro clínico inicial era de dor abdominal e diarreia, seguido de enfraquecimento na sensibilidade sensorial. Naquela época, mais de 10.000 japoneses foram diagnosticados com a

doença, o que resultou na proibição de venda do clioquinol e o desaparecimento de novos casos, contudo o desaparecimento ocorreu antes que o fármaco fosse retirado do mercado farmacêutico (Bareggi & Cornelli, 2012; Pippi et al., 2017).

No entanto, embora o clioquinol tenha sido o culpado pela síndrome, relatos epidemiológicos sugerem que ele não foi o responsável, já que nenhuma outra população exibiu resposta adversa semelhante (Wehbe et al., 2017). Ainda, acredita-se que a deficiência em vitamina B12 exibida pelos pacientes que apresentaram a doença foi a responsável pelo quadro, contudo, foram realizadas pesquisas para avaliar se o clioquinol era capaz de alterar o metabolismo da vitamina e os pesquisadores chegaram a conclusão de que ele tem o potencial de reduzir a absorção e o acúmulo da vitamina no corpo. Entretanto, uma outra hipótese abordada para relacionar os efeitos colaterais neurológicos associados ao clioquinol, refere-se a suscetibilidade genética entre os japoneses já que a incidência da doença em outros países era praticamente nula (Bareggi & Cornelli, 2012).

Hoje em dia, há controvérsia relacionadas a associação entre o clioquinol e a síndrome, uma vez que como já mencionada ela ocorreu apenas no Japão e tem sido relacionada a deficiência em vitamina B (Bareggi & Cornelli, 2012). Por outro lado, em estudos com animais foi encontrada neurotoxicidade como um efeito colateral do antiparasitário, no entanto, as doses responsáveis pelo dano excederam a necessária para o tratamento de doenças como Alzheimer e tumores (Mao & Schimmer, 2008). Inclusive no ano 2000, o interesse pelo clioquinol ressurgiu como um potencial tratamento para Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington. Atualmente, o clioquinol está disponível como uma formulação tópica para o tratamento de infecções fúngicas e antiparasitárias, além de ser utilizado em associação com outros fármacos, quando direcionado para combater infecções fúngicas, acredita-se que atue sobre a parede celular causando danos na mesma, sendo que em espécies de *C. albicans* inibiu a formação de pseudohifas, além de estar vinculado à quelação de metais como cobre, ferro e zinco (Bareggi & Cornelli, 2012; Pippi et al., 2019).

Um outro fármaco que tem se destacado nos últimos anos quanto ao seu potencial de redirecionamento é a nitroxolina. A nitroxolina demonstrou recentemente atividade antifúngica contra cepas de *Candida auris* (Fuchs et al., 2021). Esse fármaco também pertence a classe das 8-hidroxiquinolinas, e é um antibacteriano utilizado para o tratamento de doenças infecciosas na bexiga, principalmente bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Neisseria gonorrhoeae*, contudo a sua utilização

ocorre principalmente na Alemanha (Fuchs et al., 2019; Schwarze-Zander et al., 2019). Alguns estudos têm relatado os possíveis mecanismos de ação da nitroxolina, alguns dizem que ela tem o poder de quelar íons metálicos, outros relacionam o antibacteriano como um removedor de biofilme, no entanto nenhum deles determinou o exato mecanismo de ação do fármaco na célula fúngica (Petrow et al., 2018; Wijma et al., 2018).

Como observado acima, a busca por novas opções terapêuticas tem sido constante, além do redirecionamento de fármacos utilizado como estratégia terapêutica, tem-se a associação entre fármacos, e ela também tem provado ser promissora para combater infecções por fungos resistentes e formadores de biofilme (De Chaves et al., 2020). Ademais, o estudo da interação entre fármacos tem uma longa história para os antimicrobianos, a adoção de associações duplas ou triplas entre eles mostram interações positivas quando se trata de inibir o crescimento de um microrganismo, pois quando dois ou mais medicamentos são associados e leva-se em consideração os diferentes mecanismos de atuação deles, os resultados tendem a ser mais satisfatórios quando comparados aos resultados obtidos com um único agente (Odds, 2003, Johnson et al., 2004).

Além disso, são diversos os benefícios apresentados pelas associações, como por exemplo, quando associados os fármacos impedem o desenvolvimento de resistência, pois reduzem a pressão seletiva e diminuem o risco de mutações, além disso, a concentração é diminuída, resultando na redução da dosagem terapêutica e redução da toxicidade. Um outro fator muito relevante é que o efeito fungistático é potencializado de maneira que atuem como fungicidas (Fuentefria et al., 2017; Ježíková et al., 2019). Ainda, estudos têm demonstrado que quando associados, eles atuam fortemente sobre a formação de biofilme, impedindo a aderência ou até mesmo removendo os mesmos.

Por exemplo, De Chaves et al. (2020) relataram o impedimento da formação de biofilme quando associado o clioquinol com os antifúngicos voriconazol ou ciclopirox olamina, sendo a eficácia das associações altíssima, cerceando a faixa de dano celular acima de 90%. Os autores também observaram que na presença dos antifúngicos sozinhos, como o voriconazol, a concentração necessária para impedir a formação de biofilme por *F. solani* foi de aproximadamente 100 vezes maior do que quando comparada a concentração exigida para eliminar as células fúngicas planctônicas.

Em contrapartida, Da Costa et al. (2020) observaram que quando associados o clioquinol com terbinafina e ciclopirox olamina *in vitro*, eles foram efetivos em eliminar a forma planctônica de *T. rubrum* e *M. canis* em concentrações extremamente baixas (valores entre 0,0156 µg/mL – 0,125 µg/mL). Por outro lado, quando avaliado o potencial da associação em remover o biofilme formado sobre cascos suínos e pelos, a mesma associação foi capaz de remover 100% dos biofilmes sobre os modelos *ex vivo* (Da Costa et al., 2020). O estudo de Santos et al. (2003) demonstrou que a utilização das associações entre ciclopirox com cetoconazol e ciclopirox com itraconazol são mais efetivas do que a monoterapia. Assim como Perrins e Bond (2003) demonstraram que a associação entre miconazol e clorexidina pode ser um potente antimicótico contra *M. canis*.

3. 8 Abordagens *in vitro*

Os primeiros computadores digitais programáveis surgiram na década de 70 e a partir de então, programas de modelagem e simulação vem sendo cada vez mais utilizados a fim de garantir a eficácia e segurança de novos medicamentos ou com potencial de reposicionamento (Pappalardo et al., 2018). Esse tipo de abordagem, que é denominada abordagem *in vitro* tem demonstrado capacidade de gerar previsões confiáveis, bem como revelar novos modos de ação, assim como efeitos colaterais (Pinero et al., 2018). No caso de fármacos em situação de reaproveitamento, as abordagens *in vitro* revelam ser eficientes, além de econômicas e estima-se que cerca de 75% dos medicamentos já existentes poderiam ser reposicionados para várias doenças (Singh et al., 2020).

Dentre as estratégias *in vitro* utilizadas têm-se a docking molecular, que é uma abordagem computacional capaz de prever a complementariedade do sítio de ligação entre o ligante (fármaco) e o alvo (receptor), ou seja, é utilizada para prever a posição, orientação e as pontuações de ligações de pequenas moléculas a proteínas (Torres et al., 2019). Todavia para que o teste seja efetivo, é necessário o conhecimento prévio de um alvo receptor, dessa maneira vários fármacos podem ser testados contra esse alvo específico, por outro lado, uma biblioteca de fármacos pode ser testada contra uma série de receptores alvo para identificar possíveis novas interações (Pushpakom et al., 2019).

O primeiro passo para o estudo de docking envolve a obtenção da estrutura alvo que geralmente contempla uma grande molécula biológica como proteína, RNA ou DNA que podem ser recuperadas do “*Protein Data Bank*”, este por sua vez, fornece as coordenadas atômicas 3 D do alvo (Pushpakom et al., 2019). Vários estudos têm descoberto alvos terapêuticos para fármacos que podem ser reposicionados, por meio de docking molecular, por exemplo, Lehrer e Eheinsteim (2020) constataram *in vitro* a efetividade da ivermectina contra SARS-COV2 mas não descartaram a confirmação por testes *in vitro* e *in vivo*. Por outro lado, Mhatre e Patravale (2021) revelaram a atividade *in vitro* de quatro antifúngicos (pramiconazol, itraconazol, posaconazol e cetoconazol) contra mucormicose. A mucormicose é uma infecção fúngica respiratória e que tem se destacado em pacientes com covid-19, o tratamento atual envolve a utilização de anfotericina B e isavuconazol.

Da mesma forma, abordagens *in vitro* também têm sido direcionadas para avaliação de toxicidade, por exemplo, De Chaves et al. (2020) observaram na previsão que o clioquinol não demonstrou ser hepatotóxico assim como a natamicina, enquanto o voriconazol, terbinafina e ciclopirox poderiam causar danos para enzimas hepáticas, caso administrados por via sistêmica. Em contrapartida, os autores relataram que as associações entre clioquinol e voriconazol ou ciclopirox poderiam ser administradas por via tópica já que não demonstraram nenhum tipo de alergenicidade pelo método *in vitro*.

A toxicologia computacional, é utilizada para estimar o nível de toxicidade de um composto específico, ou seja, tem como finalidade simular ou prever a toxicidade de um determinado fármaco ou produto, e possui o benefício de minimizar a necessidade de testes em animais, dessa forma reduz o tempo e o custo dos testes de toxicidade, melhorando a previsão de toxicidade e a avaliação de segurança (Kaminski et al., 2020). São vários os softwares online que preveem o risco tóxico, dentre eles têm-se o *LAZAR Toxicity Predictions* que é utilizado para prever potenciais carcinógenos, assim como o preADMET que se baseia na identificação de agentes tóxicos capazes de ocasionar câncer, enquanto o software pkCSM é responsável por avaliar o potencial de mutagenicidade (Helma et al., 2006; Zuravski et al., 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de realização da Pesquisa

Os ensaios realizados nesse estudo contemplaram o envolvimento do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (LPMA), localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o qual realizou grande parte dos experimentos, também envolveu o Laboratório de Bioquímica e Toxicologia do Instituto Federal de Santa Catarina (Concórdia, Brasil), que realizou os ensaios de citotoxicidade, assim como da Universidade Federal do Pampa, que avaliou a toxicidade *in vitro* dos antifúngicos quando combinados e do Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da Universidade Federal do Amapá (Brasil) que determinou por análises *in vitro* o mecanismo de ação da nitroxolina.

4.2 Cepas Fúngicas

Para a realização dos experimentos foram utilizadas 30 cepas fúngicas (tabela 1). Todas as cepas são provenientes da micoteca do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (LPMA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tabela 1. Cepas fúngicas.

Espécie	Código
<i>C. albicans</i>	CAMT03
<i>C. tropicalis</i>	CTMT18
<i>F. falciforme</i>	F9, F20 e HCF19
<i>F. keratoplasticum</i>	F21, HCF17, HCF20, HCF25, HCF26
<i>F. incarnatum</i>	F16
<i>F. oxysporum</i>	F24, F35, HCF22 e HCF46
<i>F. petroliphilum</i>	HCF13 e HCF24
<i>F. proliferatum</i>	F2
<i>F. solani</i>	F28, F33, F34, HCF41, ATCC 36031
<i>M. canis</i>	MCA01, MCA29 e MCAHCPA11
<i>M. gypseum</i>	MGY58
<i>T. rubrum</i>	TRU45, TRU47 e TRU51

4.3 Antifúngicos e preparo das soluções

Para a realização dos ensaios foram utilizados os seguintes antimicrobianos: anfotericina B (Pfizer, New York, NY), clioquinol (Sigma-Aldrich), terbinafina (Sigma-Aldrich), ciclopirox olamina (Medley), micafungina (Sigma-Aldrich), natamicina (Sigma-Aldrich), voriconazol (Sigma-Aldrich) e nitroxolina (Sigma-Aldrich). Todos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) e diluídos em RPMI 1650 na concentração de 2%. O preparado das soluções contendo os antifúngicos seguiu as orientações estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2008).

4.4 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos antifúngicos

A CIM foi determinada pelo Método de Microdiluição em Caldo RPMI 1640 e seguiu as orientações dos protocolos M38-A2 para fungos filamentosos e M27-A3 para leveduras, conforme proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI*, 2008. Resumidamente, o inóculo foi preparado de maneira que se obtivesse a concentração final de 5×10^4 conídio/mL para *Fusarium*, 1 a 5×10^6 blastoconídio/mL para *Candida* spp. e 2 a 6×10^3 conídio/mL para dermatófitos.

Para a realização do ensaio foi utilizado microplacas de 96 poços estéreis e a elas foram adicionados 100 µl de caldo RPMI em cada poço, com exceção do primeiro, que neste, foi adicionado 100 µl do antifúngico que passou por microdiluição seriada, descartando-se o volume final após o décimo poço da microplaca. Posteriormente, aos poços foram adicionados 100 µl de inóculo fúngico e as microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico. Para a realização do ensaio foi incluído um controle negativo (controle de esterilidade) e um controle positivo (caldo RPMI e suspensão fúngica). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.5 Investigação *in vitro* da formação de biofilme de *Fusarium* spp. e dermatófitos pelo método do cristal violeta

Para a avaliação da formação de biofilme foi feita uma adaptação das metodologias de Shin et al (2002), Stepanović et al. (2007) e Galletti et al. (2017), para

adequá-las aos modelos fúngicos. Brevemente, o inóculo foi preparado de maneira que contemplasse a concentração final de 1×10^6 conídio/mL no poço da microplaca. Após o preparo do inóculo, alíquotas de 20 μ L da suspensão final foram transferidas para microplacas de 96 poços e completadas com 180 μ L de caldo TSB. As microplacas foram então incubadas a 32 °C por 72 h. Passado o período de incubação, o conteúdo dos poços foi removido com o auxílio de uma micropipeta e os poços foram lavados com salina estéril a fim de remover as células não aderentes. Em seguida, foram adicionados 150 μ L de metanol (99,9%) que permaneceram nos poços durante 20 minutos para propiciar a fixação do biofilme. Posteriormente, o composto químico foi retirado e as microplacas foram invertidas por 30 minutos com o intuito de permitir a secagem dos poços.

Sequencialmente, aos poços foram acrescentados 150 μ L de cristal violeta na concentração de 1%, que permaneceu no local por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, o excesso de corante nos poços foi removido e eles foram lavados com salina estéril. Em seguida, o corante ligado as células foi ressolubilizado por meio da adição de 150 μ L de etanol (100%), e este permaneceu por 30 minutos em contato com o corante. Por fim, a avaliação da formação de biofilme, foi feita em espectrofotômetro (SpectraMax, KAZUAKI) por meio da medição da absorvância em um comprimento de onda de 620 nm (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação da produção de biofilme de acordo com a faixa de absorvância exibida quando submetida ao método do cristal violeta.

Produtor de Biofilme	Faixa de absorvância
Não produtor	< 0,070
Fraco	0,070 e 0,170
Médio	0,170-0,279
Forte	> 0,280

Fonte: Shin et al. (2020)

4.6 Análise da Concentração Antibiofilme Mínima dos antifúngicos selecionadas frente a espécies de *Fusarium* e dermatófitos

Após determinar a CIM das cepas de *Fusarium* spp. e dermatófitos, foi avaliada a Concentração Antibiofilme Mínima (CAM) dos antifúngicos. Basicamente, para as cepas de *Fusarium* oriundas de casos de ceratite (artigo 1), foi avaliado os antifúngicos

natamicina, voriconazol, anfotericina B e clioquinol. Por outro lado, para as cepas de *Fusarium* e *T. rubrum* provenientes de onicomicose, a terbinafina, clioquinol e ciclopirox foram testados, assim como para as cepas de *M. canis* causadoras de tinea capitis.

Resumidamente, para a realização deste ensaio, foi feita uma adaptação das metodologias de Vila et al. (2015) e Carbone et al. (2018), a fim de adequá-las aos microrganismos em questão. Primeiramente, o inóculo foi preparado de maneira que contemplasse a concentração final de 1×10^6 conídio/mL. Na sequência, foram adicionados nas microplacas 100 μ L dos antifúngicos previamente dissolvidos em caldo TSB. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L da suspensão fúngica final, em cada poço da microplaca. Adicionalmente, as microplacas foram incubadas por 72 h a 35 °C. Em seguida, o conteúdo de cada poço foi removido e os poços foram lavados com salina estéril. Adicionalmente, a inibição da formação do biofilme foi quantificada pela adição do reagente colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; Sigma).

O MTT associa-se as células viáveis do biofilme, uma vez que estas acumulam por endocitose o sal de tetrazólio (MTT), que na célula é reduzido por desidrogenases mitocondriais a cristais de formazan solúveis em álcool. Para tanto, foram adicionados aos poços da microplaca 150 μ L de uma solução de MTT (0,5 mg/ml), e em seguida as microplacas foram incubadas por 5 h a 35 °C. Passado o período, a solução foi retirada e os cristais de formazan foram homogenizados com 150 μ L de álcool isopropílico. Na sequência, a leitura das amostras foi realizada no comprimento de onda 620 nm. O ensaio foi efetuado em triplicata e lido em espectrofotômetro. Foi considerado como resultado positivo o antifúngico que inibiu >80% da formação do biofilme. O percentual de inibição foi calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = \left[\frac{(\text{OD controle de crescimento} - \text{OD amostra})}{\text{OD controle de crescimento}} \right] \times 100$$

Para a realização deste ensaio, foi utilizado um controle negativo (apenas o TSB) e um controle positivo (TSB e inóculo fúngico). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Avaliação da Concentração Mínima Erradicadora de Biofilme (CMEB) das moléculas selecionadas frente a espécies de *Fusarium*, *T. rubrum* e *M. canis*

Para a avaliação da CMEB foi realizada uma adaptação das metodologias de Ramage et al. (2001) e Carbone et al. (2018) com o intuito de adequá-las ao modelo fúngico. Brevemente, 100 µL de inóculo (1×10^6 conídio/mL) e 100 µL de caldo TSB foram adicionados aos poços da microplaca. As microplacas foram incubadas por 72 h a 32 °C e após a maturação do biofilme, o sobrenadante foi aspirado e as células não aderentes foram removidas por lavagem com salina estéril (150 µL).

Posteriormente, foram adicionados 100 µL de caldo TSB aos poços da microplaca, para renovar o meio de cultivo e 100 µL dos antifúngicos em diferentes concentrações. Adicionalmente, as placas foram novamente incubadas por 48 h a 32°C. O remanescente foi removido e os poços enxaguados com solução salina estéril. Em seguida, aos poços das microplacas foram adicionados o corante MTT seguido de isoprpanol (conforme item 4.6) e a absorbância foi determinada em leitor de placas no comprimento de onda de 620 nm. A CMEB será definida como a menor concentração capaz de remover pelo menos 80% das células viáveis. O percentual de remoção foi avaliado conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de remoção} = (\text{OD}_{\text{controle de crescimento}} - \text{OD da amostra}) / \text{OD}_{\text{controle de crescimento}} * 100$$

Para a realização deste ensaio, foram utilizados um controle negativo (apenas o TSB) e um controle positivo (TSB e inóculo fúngico). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8 Determinação da atividade antibiofilme dos antifúngicos comerciais pelo método de checkerboard

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas as recomendações de Johnson et al. (2004) com modificações. Foram utilizadas microplacas de 96 poços para determinar o efeito da associação entre os antifúngicos sobre a formação do biofilme, para tanto, foram estabelecidas combinações entre eles de maneira que totalizaram nas microplacas 36 combinações com concentrações variadas.

As soluções de trabalho (antifúngicos) foram preparadas em caldo TSB, de modo que se obtivesse uma solução quatro vezes mais concentrada do que a concentração final desejada e volumes de 50 µl do clioquinol foram adicionados aos poços da microplaca e combinados com 50 µl dos diferentes antifúngicos (anfotericina B, voriconazol, natamicina, ciclopirox olamina ou terbinafina). Posteriormente foi adicionado o inóculo fúngico na concentração de 1×10^6 conídios/mL e as microplacas foram incubadas por 72h a fim de propiciar a formação do biofilme. Após, os demais processos de lavagem e coloração do biofilme, foram realizados conforme o item 4.6.

A análise da interação entre os dois fármacos foi determinada por meio do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), no qual escolheu-se as menores concentrações das amostras testes e que foram capazes de inibir a formação do biofilme. Esse índice foi calculado através da soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIF) de cada antifúngico para cada combinação:

$$\text{ICIF: } \text{CIF}^A + \text{CIF}^B$$

ICIF: CAM A em combinação com CAM B/ CAM A sozinho + CAM B em combinação com CAM A/ CAM B sozinho

A interação foi considerada sinérgica quando $\text{ICIF} \leq 0.5$, aditiva para $0.5 < \text{ICIF} < 1$; indiferente para $1 \leq \text{ICIF} < 4$ e antagônica quando o ICIF for ≥ 4 .

4.9 Determinação da atividade removedora de biofilme pelo método de checkerboard

Com o intuito de observar se os antifúngicos em combinação eram eficazes em remover o biofilme formado e poderiam ter efeito sinérgico entre si, foram combinados os antifúngicos entre si. Para tanto, foram determinadas nos poços de microplacas de fundo chato, 36 combinações que contemplaram concentrações quatro vezes maiores e oito vezes menores que a CMEB.

Resumidamente, o biofilme passou pelas etapas de formação e remoção das células não aderentes, posteriormente foram acrescentados às microplacas 50 µl do antifúngico A (em diferentes concentrações) combinado com o antifúngico B (em diferentes concentrações), seguido de 100 µl de caldo TSB, para renovação do meio de cultura. As microplacas foram novamente incubadas e as etapas posteriores foram conforme o item 4.6. O ensaio foi realizado em triplicate e foi avaliado o dano celular dos poços que não apresentaram nenhum crescimento fúngico. O percentual de dano celular foi calculado por meio da seguinte equação:

$$\left[1 - \left(\frac{A620 \text{ with drug}}{A620 \text{ without drug}}\right) * 100\right]$$

Foram consideradas sinérgicas as associações que exibiram índice de concentração inibitória fracionada (FICI) ≤ 0.5 , indiferença >0.5 , antagonismo >4 . Para tanto, o FICI foi calculado da seguinte maneira: $FICI_{A(MICA+B/MICA)} + FICI_{B(MICB+A/MICB)}$ (De Chaves et al., 2020).

4.10 Time-Kill Combination sobre *Fusarium* na forma plactônica

O ensaio de *time-kill combination* têm três finalidades, a primeira está relacionada a confirmação de que o teste de checkerboard realmente funcionou, ou seja, por meio do ensaio é possível confirmar se a associação foi sinérgica ou não, a segunda envolve a interpretação dos gráficos que confirmam se a associação teve atividade fungicida ou fungistática, enquanto a terceira, demonstra o tempo de morte da célula fúngica. Resumidamente, o ensaio foi realizado conforme Natesan et al. (2008) com modificações. Para tanto, foram escolhidas as melhores associações com atividade sinérgica, ou seja, o menor valor de ICIF e que nesse caso representou a associação entre CLIO-VRC (1.25 µg/mL/12 µg/mL) e CLIO-CPX (1.6 µg/mL/20.8 µg/mL), os antifúngicos sozinhos também foram incluídos nas respectivas concentrações.

O ensaio contemplou a utilização de microplacas de 12 poços com e sem os antifúngicos junto com o inóculo fúngico (1×10^6 conídio/mL). As microplacas foram incubadas a 32°C e em diferentes intervalos de tempo (0, 4, 8, 12 e 24h), uma alíquota de cada poço foi seriadamente diluída (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em água estéril e posteriormente adicionadas a placas de Petri contendo ágar batata dextrose, onde foi

realizado o espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 32°C por 48 h a fim de determinar o número de UFC/mL.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias fúngicas e os resultados foram expressos por meio da plotagem dos valores de \log_{10} UFC/mL. A associação foi considerada fungicida quando houve redução $\geq 99,9\%$ do número de células em relação ao inóculo inicial (controle sem tratamento em tempo 0). A interação foi considerada sinérgica quando houve o decréscimo $\geq 2\text{-}\log_{10}$, indiferente (decréscimo $< 2\text{-}\log_{10}$) ou antagonista (aumento $\geq 2\text{-}\log_{10}$) após 24 h de tratamento com a combinação, comparado ao composto mais ativo sem combinação. Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

4.10.1 Time-Kill Combination sobre biofilme de dermatófitos

O ensaio foi realizado de acordo com as orientações de Soares et al. (2019) e De Chaves et al., 2020. Basicamente, foram preparados em eppendorfs (1.5 mL) soluções contendo o meio de cultivo RPMI 1640 junto com 1×10^6 conídios/mL que foram cultivados por 72h a 32°C para a formação de biofilme. Após, os biofilmes foram lavados com salina estéril (0.85%), que permitiu o desalojamento das células não aderentes por vortex, sonificados por 8 min e na sequência microdiluídos (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) e desafiados com os antifúngicos sozinhos CLIO (16 $\mu\text{g/mL}$), CPX (32 $\mu\text{g/mL}$) e em combinação CLIO/CPX (16 $\mu\text{g/mL}$ /32 $\mu\text{g/mL}$). Os mesmos foram novamente incubados em estufa de crescimento e a contagem das células viáveis foi realizada por meio da técnica de spread plate após 0, 24, 48 e 72h.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias fúngicas e os resultados foram expressos por meio da plotagem dos valores de \log_{10} UFC/mL. Conforme o item 4.10. Ao experimento foram adicionados um controle de crescimento (inóculo fúngico com meio de cultivo) e um controle de esterilidade (meio de cultivo). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.11 Determinação do potencial alergênico das associações propostas para uso em onicomicoses e ceratite por *Fusarium* spp.

A avaliação do potencial de irritação ou alergenicidade dos antifúngicos sozinhos e em associação CLIO/CPX e CLIO/VRC foi realizada através do ensaio da

membrana corioalantóide de ovo de galinha embrionado (HET-CAM), conforme proposto ICCVMA (2010). Resumidamente, a membrana corioalantóide é escolhida, pois é uma membrana respiratória vascularizada com processo inflamatório e vascular similar ao tecido conjuntivo ocular, e, portanto, é indicada para testes de alergenicidade ou irritação.

Para a realização desse ensaio, foram utilizados os antifúngicos sozinhos e em associação nas seguintes concentrações: CLIO (10 µg/mL), VRC (80 µg/mL) CPX (125 µg/mL), em combinação entre CLIO-VRC (1.25 µg/mL/12 µg/mL) e CLIO-CPX (1.25 µg/mL/17.4 µg/mL). Brevemente, foram utilizados ovos frescos, brancos e embrionados (Lohmann selecionado Leghorn, LSL), que foram incubados por 10 dias em uma temperatura que variou entre 38 a 39°C e umidade entre 55 a 60%. No último dia, a casca do ovo foi removida com uma ferramenta rotativa (Dremel, WI) e foram adicionados à membrana corioalantóide 0,3 ml dos antifúngicos sozinhos e em combinação. Ao ensaio foram incluídos um controle negativo (solução salina 0,9%) e um controle positivo (solução NaOH 0,1 mol/L).

Em diferentes intervalos de tempo (0.5, 2 e 5 min) foi feita a observação visual do efeito irritante sobre a membrana corioalantóide e os resultados foram interpretados em uma escala de 0 a 21, onde 0 a 4,9 não representa irritação ou praticamente sem irritação, 5 a 8,9 (irritação moderada) e de 9 a 21 refere-se à irritação moderada/grave ou extrema.

O escore de irritação foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$IS = \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de hemorragia})}{300} \right) x 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de Lise})}{300} \right) x 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de coagulação})}{300} \right) x 9 \right)$$

4.12 Avaliação do potencial citotóxico das associações propostas para uso em onicomicoses e ceratite por *Fusarium* spp.

A avaliação da citotoxicidade das associações foi realizada por meio do teste de viabilidade celular e seguiu as orientações de Montagner et al., (2010). Basicamente, o ensaio é utilizado para avaliar se os antifúngicos quando combinados podem levar à morte celular ou causar algum tipo de dano, ou seja, a técnica verifica a viabilidade e proliferação das células quando expostas a diferentes concentrações

dos antifúngicos em associação. Nesse ensaio foram utilizados o CLIO combinado com VRC (1.25 µg/mL/12 µg/mL, 2.5 µg/mL/24 µg/mL, 5 µg/mL/48 µg/mL e 10 µg/mL/96 µg/mL) e CLIO combinado com CPX (1.6 µg/mL/20.8 µg/mL, 3.2 µg/mL/41.6 µg/mL, 6.4 µg/mL/83.2 µg/mL and 12.8 µg/mL/166.4 µg/mL). O ensaio foi realizado em triplicata e cerca de 100 células foram analisadas para cada associação. Ao ensaio foi adicionado um controle negativo que foi preparado com 500 µl de tampão PBS 7.4, e um controle positivo com 3 µg/ml de bleomicina.

Resumidamente, a partir de 1 mL de sangue humano, os linfócitos são separados por centrifugação e transferidos para 9 mL de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina, à essas soluções são adicionados os antifúngicos combinados nas diferentes concentrações que são incubados a 37°C por 72h. Após esse período, uma alíquota de cada solução é retirada e acrescentado o azul de tripan (contato por 8 minutos) com posterior análise em microscópio óptico (objetiva de 400x).

Por microscopia, as células são contadas em câmara de Neubauer e são classificadas em duas categorias, (1) células viáveis e (2) células inviáveis. (1) representa células com citoplasma claro, enquanto (2) representa células que incorporam o corante e apresentam membranas disformes e núcleo corado de azul. A coloração pelo azul de tripan é amplamente utilizada para ensaios de citotoxicidade, pois as células danificadas absorvem o corante para o citoplasma, o que não acontece com as células viáveis, que por sua vez permanecem intactas e incolores, permitindo então a diferenciação entre células incolores e coradas (Avelar-Freitas et al. 2014).

O ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pampa sobre o número 27045614.0.0000.5323. O teste foi realizado com o consentimento de um voluntário adulto jovem (maior de 18 anos) e sem uso de medicamentos.

4.13 Predição da toxicidade das combinações eleitas para o combate de onicomicose e ceratite por *Fusarium* spp.

As análises computacionais para prever a toxicidade *in vitro* das associações (CLIO-VRC e CLIO-CPX) foram realizadas na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA). Resumidamente, foram utilizados a partir de suas respectivas bases de dados, cinco programas de computador on-line e de código aberto (pkCSM®, PreADMET®, Molinspiration Cheminformatics®, ChemIDPlus®, LAZAR Toxicity

Predictions®) para simular e prever o risco tóxico dos antifúngicos, através da seleção de variáveis e dados físico-químico, *in vitro* e *in vivo*. As análises foram realizadas por meio da aplicação de cálculos específicos entre esses programas e que geraram uma probabilidade de risco preditivo para diferentes moléculas. Em um primeiro momento, os códigos SMILE canônicos de cada medicamento foram obtidos através do banco de dados PubChem. Na sequência, os códigos foram utilizados para avaliar a análise de risco. Todos os parâmetros estudados com suas respectivas interpretações estão descritos do artigo de De Chaves et al. (2020). Para validar a análise dos resultados, três análises intradiárias e interdias foram realizadas nos mesmos programas de computador por dois computadores diferentes (OECD, 2007).

4.14 Predição dos mecanismos de ação da nitroxolina *in vitro* e *in vitro*

4.14.1 Ligação ao ergosterol exógeno

O ensaio de ligação ao ergosterol exógeno é utilizado para avaliar a capacidade de um antifúngico ou antimicrobiano se ligar ao ergosterol exógeno, já que a presença dele no meio de cultura confunde o agente de tal forma que ocorre uma interação entre os dois, ligando-se eles entre si e resultando na permanência do ergosterol da membrana celular fúngica intacto, dessa forma, espera-se que a CIM aumente quando o antimicrobiano é exposto a diferentes concentrações de ergosterol exógeno (Escalante et al., 2008).

Resumidamente, as células fúngicas foram colocadas em contato com a nitroxolina na presença e ausência de ergosterol exógeno (Sigma – Aldrich) em diferentes concentrações (50 a 250 µg/ml) e incubadas por 32°C por 48 h para fungos leveduriformes e 96h para fungos filamentosos. O ensaio seguiu as orientações estabelecidas pelo CLSI (2008) protocolos M27-A3 e M38-A2 para a determinação da concentração inibitória mínima através do método de microdiluição em caldo. As CIMs foram determinadas visualmente pela ausência ou presença de crescimento fúngico. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B que se liga ao ergosterol de membrana formando poros e permitindo a saída do conteúdo intracelular (Pippi et al., 2019).

4.14.2 Ensaio de proteção do sorbitol

A fim de verificar se a nitroxolina afeta a integridade da parede celular fúngica, foi realizado o ensaio de proteção do sorbitol (Escalante et al., 2008). Para tanto, a CIM da nitroxolina foi determinada na presença e ausência do sorbitol (0.8 mol l⁻¹, Sigma – Aldrich). Tanto a CIM quanto o preparo do inóculo, seguiram as orientações dos protocolos M27-A3 e M38-A2 do CLSI (2008). Resumidamente, o sorbitol foi dissolvido em RPMI 1640 e as microplacas foram incubadas a 35°C por um período de 2 a 7 dias para fungos leveduriformes e entre 4 e 7 dias para os fungos filamentosos. A CIM foi determinada visualmente através da presença ou ausência de crescimento fúngicos nos poços das microplacas (Escalante et al., 2008).

O ensaio foi realizado em triplicata e a anidulafungina foi utilizada como controle positivo. Na presença do sorbitol, a parede celular não é rompida, já que ele atua como um protetor osmótico da parede e na presença do antimicrobiano, espera-se que a CIM aumente caso o alvo seja a parede celular. A micafungina atua sobre a parede celular ligando-se a glucano sintase e impedindo a formação da parede celular (Pippi et al., 2019).

4.14.3 Predição *in vitro* de atividade biológica

A predição da atividade *in vitro* da nitroxolina foi realizada pelo Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da Universidade Federal do Amapá (Brasil). As análises foram efetuadas por meio do webserver PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) (Lagunin et al., 2000), que explorou a possível atividade biológica da nitroxolina, tendo como base a estrutura química da molécula. Resumidamente, o PASS utiliza fragmentos moleculares 2D que são conhecidos como descritores de estrutura de vizinhança dos átomos de vários níveis (MNA), e propõe a atividade biológica segundo a estrutura molecular da molécula analisada. Dessa forma, o webserver fornece um resultado em pontuação de predição do composto, que é calculado em razão da probabilidade de ser ativo (Pa) e da probabilidade de ser inativo (Pi). Uma predição com valor de Pa alto quer dizer provável atividade biológica (Jairajpuri et al., 2021).

Na sequência, a nitroxolina foi avaliada no SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), um webserver que realiza a predição de combinação de similaridade 2D e 3D de pequenas moléculas com alvos

macromoleculares. Nesse sistema de predição, cada átomo da molécula predita é mapeado em um espaço 5D, no qual são determinadas as três primeiras coordenadas das conformações 3D da molécula e as duas conformações que sobram são codificadas as suas cargas atômicas parciais e a sua lipofilicidade (AlogP). Ao final da predição é gerado um valor de conformação com aproximadamente 400 comparações e selecionado pelo Servidor Swiss, o maior valor de similaridade (Gfeller et al., 2013).

Na sequência, foi utilizado o Cortellis Drug Discovery Intelligence (CDDI) no intuito de se observar os mecanismos de ação e os alvos utilizados da nitroxolina, baseado em pesquisas realizadas e descritas no banco de dados dessa plataforma. o CDDI fornece dados de estudo *in vitro*, *in vivo* e até mesmo estudos clínicos (Shih et al., 2018).

4.14.4 Docking molecular

A molécula nitroxolina foi desenhada e otimizada pelo *software HyperChem* (Gutowska et al., 2014). O programa *GOLD 2020.1* (Genetic Optimisation for Ligand Docking) foi utilizado com a finalidade de prever os melhores modelos de interações entre a nitroxolina e as proteínas alvo estudadas, estas por sua vez foram obtidas a partir da plataforma Protein Data Bank (PDB) (Ortega-Carrasco et al., 2014).

A estrutura cristalográfica da alceno monooxigenase (PDB ID: 3B9O) complexada com a coenzima FMN, e a estrutura cristalográfica da metionina amino peptidase (PDB ID: 2EVO) complexada com a molécula n-ciclopentil-n-(tiazol-2-il) oxalamida foram os alvos selecionados para o estudo de docking molecular (Xie et al., 2006; Li et al., 2008). Nesse processo, átomos de hidrogênios foram adicionados, as moléculas de água e os ligantes foram retirados, que no fim foram validados, onde obteve-se os valores RMSD (Root-Mean-Square Deviation), os cálculos de cavidade de origem e o valor do raio de validação.

DISCUSSÃO GERAL

No globo terrestre, nenhum ser vivo está isolado, pode-se dizer que há sim uma interação entre os organismos vivos, e uma vez que essa interação é estabelecida, todo o ecossistema terrestre é comprometido e este envolve humanos, animais, plantas, solo, água e ar. É impossível não analisar esta inter-relação, um conídio que se deposita sobre uma antera, germina e se expande ao longo dos tecidos da planta, destruindo-a e deformando os grãos, produzindo micotoxinas que para serem combatidas, fungicidas agrícolas são pulverizados sobre a planta, que se depositam nela e sobre o solo, que com a chuva é lixiviado para a água, selecionando microrganismos resistentes naquele ambiente e que podem ocasionar infecção, além de prejudicar a vida marinha, estes mesmos insumos que quando absorvidos ou consumidos pelo corpo humano podem ocasionar problemas de mutagenicidade e originar câncer, em contrapartida, as mesmas micotoxinas caso não combatidas, ocasionam problemas de teratogenicidade e também resultam em câncer.

Aquém, uma criança que pelo revolvimento do solo onde brincava ou um explorador de cavernas ou caçador de tatus, inala conídios de *Paracoccidioides brasiliensis* ou *Coccidioides immitis*, que por sua vez permanecem em seus pulmões latentes por anos e depois de um tempo desenvolvem infecções fúngicas graves. Um chá de casca de eucalipto quando consumido pode ocasionar uma meningite severa, ou até mesmo o revolvimento de fezes de frangos em galinheiros ou tocas de árvores habitadas por morcegos pode resultar em histoplasmoze, um pequeno pedaço de graveto que perfura a córnea do agricultor ocasiona ceratite, o trauma na unha que gera onicomiose, o contato com animais pode ocasionar infecções por *Microporum canis*, a utilização de um cateter, uma infecção fúngica generalizada ou a inserção de um DIU (dispositivo intrauterino) a recorrência em candidíase vulvovaginal, sendo assim, não somos isolados, somos seres vivos e que interagimos com o ambiente onde estamos inseridos.

Nesse contexto, pode-se inferir que há sim a tão famosa “saúde única” e que envolve os diferentes seguimentos e setores da sociedade e do ambiente como um todo. Diante disso, para a realização desse trabalho, foram contempladas duas grandes áreas da micologia, que envolveram estudos relacionadas à micologia agrícola e à micologia clínica, ambas extremamente importantes do ponto de vista econômico e de saúde. No que tange à micologia agrícola, uma revisão sobre o

complexo de espécies de *Fusarium graminearum* (FGSC) foi realizada, o complexo foi escolhido devido a agressividade do fungo na planta, resistência aos fungicidas e produção de micotoxinas. O mesmo gênero fúngico (*Fusarium*), cujo habitat principal é o solo, é responsável por infecções agressivas em humanos, cujos patógenos são selecionados no campo pela utilização demasiada de fungicidas agrícolas e ocasionam infecções fúngicas severas em humanos e difíceis de tratar devido a resistência intrínseca que eles exibem aos principais agentes antifúngicos, que são utilizados para o tratamento de doenças fúngicas na clínica médica. Portanto, o gênero *Fusarium* foi escolhido para estudos relacionados à micologia clínica e que envolveu a avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos principais complexos de espécies de *Fusarium* relacionados a infecções superficiais como *F. solani* e *F. oxysporum*, assim como foi avaliado a atividade antibiofilme e de remoção de biofilme de combinações de antifúngicos com o intuito de descobrir a melhor combinação capaz de impedir ou remover os biofilmes em casos de ceratite e onicomicose.

Ainda, as mesmas combinações (CLIO/CPX e CLIO/TBF) foram testadas contra fungos dermatófitos causadores de onicomicose e tinea capitis, pois nos últimos anos estudos têm demonstrado que as infecções fúngicas por dermatófitos são relacionadas à biofilmes, e por essa característica também são difíceis de tratar, uma vez que o microrganismo (*T. rubrum*) se instala entre as camadas da unha que acabam o protegendo, assim como o próprio biofilme age como um verdadeiro santuário. Na região capilar, o fio de cabelo impede a permeação do antifúngico que limita a atividade do fármaco, por outro lado, *M. canis* é capaz de se expandir por toda região da cabeça e corpo degradando a queratina e ocasionando a infecção por biofilme. Nesse contexto, nós avaliamos o efeito removedor de biofilme das combinações CLIO/TBF e CLIO/CPX sobre cepas de *M. canis* e *T. rubrum*.

Ademais, o perfil de suscetibilidade dos agentes antifúngicos aos fungos comumente envolvidos em infecções fúngicas ainda não foi estabelecido no Brasil e no mundo, resultando em confusões na comunidade científica e médica quanto ao ideal tratamento para as infecções fúngicas. Portanto, foi reunido em forma de tabela, o perfil de suscetibilidade dos principais fungos envolvidos em casos de micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas e disseminadas. Além disso, foi incluído no

trabalho, o perfil de suscetibilidade de fungos endêmicos do Brasil, sendo possível inclusive consultar os principais tratamentos recomendados *in vitro*.

Devido à grande dificuldade de obtenção de novos antifúngicos no mercado farmacêutico, seja pela sua toxicidade ou até mesmo pelo longo tempo dos ensaios de fase clínica, o reposicionamento de fármacos é uma boa estratégia para o combate de infecções fúngicas, já que por ainda não serem utilizados para aquela finalidade, ainda não há resistência, além disso, já estão disponíveis estudos sobre a absorção do fármaco no corpo humano assim como a sua toxicidade, o que é um ponto positivo e que auxilia no reposicionamento de um determinado fármaco. Nesse sentido, foi avaliado a capacidade da nitroxolina em ser reposicionada como antifúngico. Para tanto, foram realizados testes de docking molecular para a determinação dos alvos terapêuticos da molécula e os resultados foram promissores.

Em um contexto geral, as infecções fúngicas que acometem humanos, animais e plantas têm aumentado significativamente nos últimos anos. Contudo, pesquisadores que compõem o seleto grupo dos micologistas concordam entre si que as infecções fúngicas são negligenciadas quando comparadas à outras doenças infecciosas. Além disso, tanto na micologia médica humana, quanto na animal e na própria micologia agrícola, o principal grupo de antifúngicos utilizado para o combate dessas patologias envolve os azóis que devido ao uso frequente e muitas vezes indiscriminado tem selecionado cepas resistentes (Silva et al., 2020). Ademais esse mesmo grupo tem sido direcionado para a utilização em revestimentos anti-incrustantes e preservação de madeira (Fischer et al., 2018), o que compromete ainda mais a saúde daqueles que necessitam da utilização desses antifúngicos.

Dessa forma, o aparecimento de fungos patogênicos ou fitopatogênicos multirresistentes é uma ameaça considerável para o controle de doenças fúngicas clínicas ou agrícolas. Fungos destruidores de plantações são responsáveis por perdas de rendimento de aproximadamente 20% em todo o mundo, com perdas adicionais de 10% após a colheita, ao passo que as taxas de mortalidades por infecções fúngicas na saúde humana, excedem à malária e o câncer de mama, sendo comparável inclusive à tuberculose e HIV (*human immunodeficiency virus*). Tanto no campo quanto na cidade, o controle desses patógenos pode ser passageiro, uma vez que os fungos são altamente plásticos e reproduzem-se rapidamente, características benéficas que geram variantes resistentes. À medida que as práticas de monocultura

estão sendo aumentadas, a quebra de proteção antifúngica é prejudicada, pois grandes áreas de culturas constituem o local ideal para o surgimento de variantes resistentes a fungicidas (Fischer et al., 2018). De certa forma, em solos que são adotadas práticas de rotação de cultura, a resistência é prejudicada, pois naturalmente ocorre a redução do inóculo patogênico naquele ambiente (Cruz et al., 2012).

No sul do Brasil, o solo fértil favorece o crescimento de muitas culturas agrícolas, no entanto, as principais são a soja, o trigo e o milho. Durante o período de inverno o agricultor cultiva principalmente trigo, e após a colheita o mesmo solo nas próximas estações pode acomodar plantações de milho, que acaba se tornando um depósito fértil para o desenvolvimento de fusariose em grãos de trigo ou milho, pois a grande quantidade de detritos orgânicos provenientes da colheita passada, age como um verdadeiro reservatório do FGSC favorecendo grandes infecções na planta e até mesmo o desenvolvimento de variantes resistentes no campo. Assim como no Brasil, um estudo na Noruega detectou o aumento da ocorrência de FGSC em cultivares de aveia, cuja incidência aumentada foi resultante de resíduos de cereais na superfície do solo (Hofgaard et al., 2016).

Obviamente, o combate dessa infecção se faz com o uso de fungicidas agrícolas e como já mencionado, os azóis são a principal classe de produtos químicos recomendados para o tratamento de doenças fúngicas como a fusariose ocasionada pelo FGSC. No entanto na clínica humana, o mesmo grupo é utilizado para o controle de doenças infecciosas fúngicas, cujo uso não racional e em demasia de fungicidas com modo de ação sítio-específico tanto no campo quanto na clínica como os triazóis, pode aumentar o risco de aquisição de resistência, principalmente resistência cruzada, contribuindo dessa forma para o aumento no espectro de resistência a múltiplos fungicidas e dessa forma favorecendo a perpetuação de cepas resistentes no ambiente (Ribas et al., 2016).

Além disso, parece que a resistência cruzada ou multidroga pode ser a força motriz para o desenvolvimento de resistência entre fungos que estão nas interfaces dos ambientes agroecossistema, doméstico e hospitalar. Por exemplo, dentre os fungos emergentes na clínica médica humana, tem-se fungos saprófitos ou fitopatogênicos que foram expostos a fungicidas triazólicos e se espalharam para o meio ambiente e infectaram humanos (Ribas et al., 2016). Em um hospital no Texas, *Fusarium* spp. colonizou um reservatório de água e ocasionou infecções fúngicas em

pacientes nosocomiais com câncer. Por outro lado, em uma análise filogenética de cepas de *F. solani*, foram encontradas cepas relacionadas a infecções em humanos e curcubitáceas (Zhang et al., 2006). Na clínica médica humana, as infecções por *Fusarium* spp. são de difícil tratamento, além da resistência adquirida, fungos que pertencem a esse gênero são intrinsicamente resistentes aos antifúngicos, principalmente aos azóis e equinocandinas, como já mencionado anteriormente, quando relacionados a biofilme a dificuldade de combate é ainda mais exacerbada pelas características próprias dos biofilmes.

Em soluções de lente de contato, por exemplo, os antifúngicos não são adicionados para reprimir o crescimento fúngico, dessa maneira, podem ser uma fonte potencial de infecção. Na solução de armazenamento ReNu com MoistureLoc, o agente antimicrobiano alexidina foi adicionado para proteção da lente, no entanto, ele é bactericida e não tem atividade contra *Fusarium* spp. fato que ocasionou a detecção de vários casos de ceratite entre os anos de 2005 e 2006 em Hong Kong, Cingapura e Estados Unidos (Walther et al., 2017). Estudos epidemiológicos relataram que os representantes envolvidos no surto se originaram do próprio ambiente ao qual o paciente estava inserido, cujos fungos (FSSC e FOOSC) contaminaram os estojos de lentes, lentes de hidrogel e as superfícies externas dos recipientes que armazenavam a solução de lente de contato multiuso (Zhang et al., 2007).

Em nosso estudo, nós observamos que uma combinação entre CLIO/VRC poderia facilmente impedir a formação de biofilmes por espécies de *Fusarium*. *In vitro* nós obtivemos excelentes resultados que poderiam ser incrementados com estudos posteriores a fim de adicionar essa combinação em soluções de lente de contato ou até mesmo, por meio do desenvolvimento de um colírio com utilização de nanotecnologia para facilitar a permeação através da córnea. Além disso, em nosso estudo, nós observamos que ambos os complexos FSSC e FOOSC são fortes formadores de biofilme *in vitro*. No entanto, ao comparar os complexos, parece que as infecções em córnea por FSSC são mais complexas e difíceis de tratar quando comparadas as espécies não-solani, sendo que exibem um curso de tratamento maior, além da necessidade exacerbada de ceratoplastia (Oechsler et al., 2013).

Segundo Walther et al. (2017) a presença de FOOSC em solução de armazenamento de lentes de contato ou até mesmo nas próprias lentes, não resulta necessariamente em uma infecção na córnea, pois de acordo com os autores, o FOOSC

não é tão eficaz em se fixar e penetrar córneas ou lentes de contato quanto o FSSC, o que poderia resultar em potencial patogênico menor quando comparado ao FSSC. Contudo, ainda que essas informações sejam relevantes, a detecção de formação de biofilme pelo FOSC, significa relacionar o microrganismo à formação de biofilmes, inclusive em lentes de contato e uma vez formado, pelas abrasões que a lente ocasiona na córnea, o microrganismo pode sim infectar a córnea e formar biofilme na região ocular. Zhang et al. (2007) demonstrou a formação de biofilme *in vitro* por FOSC em vários tipos de lentes de contato, sendo a rede de micélios observadas visualmente em algumas das lentes, além disso, ao avaliar os tipos de lentes, os dois complexos (FSSC e FOSC) penetraram as lentes de contato testadas, sendo que as lentes de contato com médio teor de água (34% a 36%) foram mais suscetíveis a penetração das hifas.

No que tange a associação entre CLIO/CPX ela provou ser efetiva em impedir a formação de biofilme *in vitro* para as cepas de *Fusarium* relacionadas a onicomicose, assim como demonstrou ter atividade removedora de biofilmes sobre as cepas de *T. rubrum* e *M. canis*, mas não foi capaz de remover os biofilmes de *Fusarium*. Portanto, podemos inferir que as diferentes composições da matriz polimérica extracelular podem influenciar na atividade antifúngica da combinação. Segundo Koo et al. (2017), há uma variabilidade de composição da matriz polimérica extracelular e diversos componentes que interagem entre si que agregam um alto nível de complexidade e muitos desafios para o desenvolvimento de terapêuticas direcionadas. Em dois de nossos estudos, nós encontramos resultados diferentes para fungos diferentes expostos a uma mesma associação que foi o CLIO/CPX, o que nos leva a inferir que essa variação na composição da matriz foi a responsável pelas divergências nos resultados de remoção de biofilme.

A matriz tem como componentes principais, ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas e carboidratos, sendo que uma das maiores divergências está relacionada as proteínas pois elas são muito variadas (Chatterjee & Das; 2019). No entanto, outros constituintes também podem influenciar na composição da matriz, por exemplo, em biofilme de *C. albicans*, a glicose foi o componente principal, ao passo que em *C. tropicalis* foi a hexosamina (Al-Fattani & Douglas, 2006). Ainda nessa linha, Pippi et al. (2018) demonstraram que o clioquinol foi capaz de reduzir a quantidade de células

aderentes e prevenir mais de 90% da formação do biofilme de *Candida* spp. quando dispositivos intrauterinos foram revestidos com o fármaco.

Em nosso estudo, nós inferimos que o clioquinol pode prejudicar o alongamento das hifas e de acordo com Baillie et al. (1999), as hifas são unidades fundamentais para garantir a integridade estrutural e a arquitetura multicamada dos biofilmes maduros. Sendo assim, uma vez impedidas de se prolongarem e avançarem na maturação do biofilme, não há a formação de biofilme e conseqüentemente desenvolvimento de uma infecção fúngica. O clioquinol com potencial de quelar metais como cobre, zinco e ferro, assim como o clioquinol, o ciclopirox possui afinidade por quelar cátions metálicos trivalentes como ferro por exemplo, e juntos os dois antifúngicos formaram a associação perfeita para impedir a formação de biofilme em *Fusarium* spp.. No entanto, uma das grandes limitações na clínica médica humana é justamente combater essa “roupa de proteção” chamada biofilme e em nosso primeiro estudo, não conseguimos remover o biofilme de *Fusarium in vitro* com a combinação, mas ela foi efetiva em remover os biofilmes de *T. rubrum* e *M. canis*.

Quando avaliamos a toxicidade das combinações, nós observamos por meio do ensaio *ex vivo* com ovo embrionado de galinha que nenhuma delas (CLIO-VRC e CLIO-CPX) foram irritantes para a membrana corio-alantóide, representando uma opção para aplicação em tecidos como a pele ou mucosas. Estudos relacionam a efetividade de fármacos quando associados à redução da toxicidade, indicando uma possibilidade terapêutica na clínica médica humana e animal, por exemplo. Da Costa et al., (2021) observou que a mesma combinação CLIO-CPX não foi irritante para a membrana corio-alantóide, pelo contrário, demonstrou resultados excelentes, com score de irritação na faixa de 2.8 (valor representa ausência de irritação), em nosso estudo, encontramos resultados similares quanto ao potencial de irritação dos fármacos quando associados. Portanto, ao associar o clioquinol com outros agentes antifúngicos, as concentrações são menores e conseqüentemente a toxicidade dos compostos reduzem (Da Costa et al., 2021).

Além disso, a possibilidade de abordagens *in vitro* complementa as análises *in vitro* e *ex vivo*, pois a partir da utilização de métodos computacionais é possível analisar, simular, visualizar ou prever a toxicidade de um determinado fármaco ou associação entre eles, ademais tem entre os objetivos complementar os testes de toxicidade existentes (Raies & Bajic, 2016). Em nosso estudo, nós confirmamos

através da predição da toxicidade que nossas combinações não foram irritantes sendo incapazes de induzir a sensibilização da pele, ao passo que poderiam ser incorporadas em formulações tópicas para o combate de onicomicose e ceratite. Nós também observamos que nenhuma das nossas associações foram citotóxicas para leucócitos humanos, e demonstraram alta viabilidade celular. Dados que nos levam a inferir que as associações são seguras para o tratamento de tais infecções fúngicas. Contudo, embora nosso grupo tenha obtido resultados promissores quanto as associações, os testes *in vivo* não devem ser descartados, a fim de analisar o efeito dos fármacos associados, bem como as respostas toxicológicas *in vivo*.

Assim como as abordagens *in vitro* podem predizer a toxicidade de fármacos, elas também têm o potencial de determinar os possíveis alvos terapêuticos de fármacos já existentes, uma vez que são capazes de determinar os alvos biológicos desses fármacos. Sendo assim, o reaproveitamento de fármacos é uma estratégia poderosa para agilizar o uso clínico de medicamentos aprovados para outros fins. As abordagens *in vitro* do tipo docking molecular podem ser uma excelente estratégia para o combate de infecções fúngicas, inclusive as relacionadas a biofilme, já que elas predizem o local de interação entre molécula-ligante. Em nosso estudo, nós avaliamos por docking molecular o potencial da nitroxolina em ser reposicionada como antifúngico, uma vez que a molécula é um antibacteriano.

Em um primeiro momento nós descobrimos que a nitroxolina possui atividade sobre duas enzimas celulares conhecidas como alcano 1-monooxigenase e aminopeptidase do tipo 2, posteriormente nós avaliamos os sítios de ligação ao qual a nitroxolina interagiu com as enzimas e observamos nove interações com a enzima alcano 1-monooxigenase e cinco com a enzima aminopeptidase. Da mesma forma que nosso grupo observou a interação biológica do ligante com o sítio alvo (nitroxolina *versus* enzimas), Muhammad et al. (2021) encontraram atividade biológica de diferentes compostos antimicrobianos sobre a enzima leucil-tRNA sintetase (LEURS), essa enzima é um membro da família das enzimas aminoacil-tRNA sintetase e desempenha um importante papel na síntese de proteínas de bactérias e fungos, sendo essencial para a sobrevivência dos microrganismos e portanto um possível alvo antimicrobiano. Os autores observaram que os compostos testados no estudo, se ligaram a enzima por meio de ligações de hidrogênio através de interações com o resíduo de aminoácido LEU317. Em nosso estudo foram formadas ligações de

hidrogênio, ligações hidrofóbicas e ligações metálicas com diversos aminoácidos, entre eles HIS138, HIS178 e VAL135.

Logo, confirmada a atividade biológica *in vitro*, nós avaliamos a atividade *in vitro* da nitroxolina sobre fungos dermatófitos, não-dermatófitos e leveduriformes. *In vitro*, os resultados encontrados confirmaram o estudo *in vitro* e destacaram a importância da utilização desse tipo de abordagens para o reposicionamento de fármacos. Nós observamos que a parede celular e a membrana citoplasmática não foram os alvos de interação da nitroxolina, e assim complementaram os resultados obtidos *in vitro*, relatando a possibilidade de interação com dois alvos biológicos. Tais achados colocam o fármaco em evidência quanto ao potencial de redirecionamento e principalmente como uma nova opção terapêutica, já que os principais alvos dos antifúngicos atuais são a rota de biossíntese do ergosterol e a parede celular. Nós podemos inferir que nossos resultados foram inéditos, uma vez que nenhum estudo até o momento avaliou os possíveis alvos biológicos da nitroxolina e demonstram uma nova opção terapêutica.

Dessa forma podemos concluir que o reposicionamento de fármacos pode auxiliar nos tratamentos de doenças infecciosas, por exemplo, em 2020, a docking molecular foi utilizada para mapear a interação entre a ivermectina e o receptor de membrana ACE2 (enzima conversora de angiotensina) presente em células humanas. Os autores observaram que a ivermectina interage com o receptor ACE2 formando interações com os aminoácidos leucina 91 e histidina 378, podendo interferir com a fixação da proteína spike à membrana celular humana (Lehrer & Rheinsteins, 2020). Estudos com modelos animais demonstraram um amplo espectro de efeitos antivirais da ivermectina, contudo, são necessários ensaios clínicos para avaliar a real eficácia da ivermectina na clínica médica humana, além de constatar sua toxicidade (Heidary & Gharebahi, 2020).

Um outro estudo também avaliou por docking molecular a possibilidade de encontrar diferentes agentes antifúngicos para o combate de mucormicose. A mucormicose entrou em evidência nos últimos anos em pacientes hospitalizados com covid, é uma doença rara e ocasionada por fungos dos gêneros *Rhizopus* e *Mucor*, estes por sua vez ocasionam infecções respiratórias ou cutâneas graves e tem como primeira linha de tratamento a anfotericina B e o isavuconazol. Por docking molecular os autores analisaram se os antifúngicos albaconazol, fluconazol, itraconazol,

cetoconazol, luliconazol, posaconazol, pramiconazol, ravuconazol e voriconazol poderiam ser redirecionados para o tratamento de mucormicose, os autores observaram que quatro antifúngicos (pramiconazol, itraconazol, posaconazol e cetoconazol) possuem forte afinidade com a enzima 14- α demetilase e portanto poderiam ser explorados para o tratamento de mucormicose (Mhatre & Patravale, 2021).

Ainda nessa linha é possível observar que poucos são os agentes antifúngicos recomendados para o tratamento de diferentes tipos de micoses humanas, um exemplo é mucormicose que foi mencionada acima. Além disso, dos poucos antifúngicos existentes alguns são direcionados como um tratamento empírico, sem ao menos se determinar a real atividade antifúngica do fármaco sobre certa espécie fúngica, a título de exemplo, o itraconazol que também já foi mencionado nesse estudo, é utilizado como tratamento empírico para fusariose ocular, no entanto, os pacientes podem não responder ao tratamento, uma vez que há resistência intrínseca por parte dos agentes envolvidos nesse tipo de doença. Sendo assim, o papel do teste de suscetibilidade antifúngica é auxiliar na seleção do melhor antifúngico para o tratamento de uma determinada infecção fúngica, já que muitos desses isolados podem ser resistentes e a avaliação da suscetibilidade permite direcionar para a melhor opção terapêutica (Espinell-Ingrof & Turnidge, 2016).

Em um contexto mundial, até o momento não está disponível um relatório que reúna os pontos de corte epidemiológicos ou até mesmo o perfil de suscetibilidade de diferentes fungos aos mais diversos agentes antifúngicos, o que se tem são os valores de referência para suscetibilidade de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* e *Tricophyton*. No entanto, como já mencionado nesse trabalho, existem aproximadamente 300 espécies fúngicas envolvidas em micoses humanas, o que demonstra uma lacuna muito grande na micologia médica, quanto ao perfil de suscetibilidade desses organismos. Diante dessa grande problemática e visando preencher essa brecha, nosso grupo reuniu em forma de tabela o perfil de suscetibilidade de 65 fungos quando expostos a aproximadamente 20 antifúngicos. Nós observamos que embora esteja disponível um arsenal terapêutico, nem todos os antifúngicos são capazes de eliminar as infecções fúngicas, sendo o teste de suscetibilidade uma importante ferramenta para revelar a melhor opção terapêutica.

Também, diante dos resultados que obtivemos nós inferimos que é muito difícil estabelecer um perfil de suscetibilidade para todos os fungos relacionados à infecções baseando-se em pontos de corte obtidos de artigos científicos, pois embora eles possam auxiliar na busca pelas melhores opções terapêuticas e demonstrar indícios de resistência intrínseca ou adquirida, não se pode descartar a importância do estabelecimento de pontos de corte e valores epidemiológicos.

Nesse contexto, nós podemos inferir que existem várias limitações que acabam dificultando o estabelecimento de um relatório que contemple os pontos de corte ou valores epidemiológicos para todas as espécies fúngicas. Por exemplo, para que seja estabelecido um ponto de corte, ou seja, uma concentração que seja capaz de eliminar um determinado microrganismo, ou demonstrar que o antifúngico não é eficaz por motivos de resistência, vários fatores são levados em consideração, entre eles, resultados *in vitro*, *in vivo* e clínicos, além de distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIMs), concentração mínima efetiva, dados relacionados a farmacocinética e farmacodinâmica, além de resultados microbiológicos (Espinell-Ingroff & Turnidge, 2016). Para que o CLSI, por exemplo, reconheça um ponto de corte, é necessário um resultado de CIM para um mínimo de 100 espécies de pelo menos três laboratórios e os cálculos para a determinação dos pontos de corte epidemiológico devem incluir métodos estatísticos (Espinell-ingroff et al., 2015).

Um estudo propôs os pontos de corte epidemiológico para FSSC e FOSC quando expostos a voriconazol, anfotericina B, posaconazol e itraconazol, no entanto, para que os autores pudessem inferir os pontos de corte, foram obtidos dados de 16 laboratórios de diferentes localizações mundiais, como Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, Europa, Estados Unidos e México, além disso, para a determinação dos valores epidemiológicos foram avaliadas até 608 valores de CIM (Espinell-ingroff et al., 2015). Portanto, nosso estudo, pode ser utilizado a fim de consulta, para auxiliar na escolha do melhor tratamento, no entanto, de forma alguma, deve ser desconsiderado o teste de suscetibilidade a antifúngicos, uma vez que ele irá determinar a melhor opção terapêutica a ser utilizada.

CONCLUSÃO

Por fim nós podemos concluir que:

- ✓ O clioquinol possui excelente atividade antifúngica e se destaca em relação aos demais agentes antifúngicos quanto a suscetibilidade de cepas de *Fusarium* spp. envolvidas em casos de ceratite e onicomicose.
- ✓ A terbinafina possui melhor atividade antifúngica quando comparada ao clioquinol e ciclopirox olamina sobre dermatófitos causadores de onicomicose e tinea capitis.
- ✓ Todas as cepas de *Fusarium* spp., *M. canis* e *T. rubrum* testadas nesse estudo foram forte formadoras de biofilme.
- ✓ Dentre os antifúngicos testados quanto ao potencial de inibição da formação de biofilme por *Fusarium* spp., o clioquinol demonstrou ser mais ativo e eliminar o biofilme em baixas concentrações quando comparado aos demais antifúngicos (NTM, VRC, TBF e CPX).
- ✓ O clioquinol demonstrou ser eficaz em impedir a formação de biofilme em cepas de *T. rubrum* e *M. canis*. TBF e CPX não foram capazes de impedir a formação de biofilme, para algumas das cepas testadas.
- ✓ Nenhum dos agentes antifúngicos testados separadamente foram capazes de remover os biofilmes de *Fusarium* spp.
- ✓ Clioquinol e CPX removeram os biofilmes de dermatófitos em concentrações elevadas. A TBF não foi capaz de remover os biofilmes.
- ✓ As associações entre CLIO-VRC e CLIO-CPX demonstraram ser sinérgicas e impediram a formação de biofilme por *Fusarium* spp..
- ✓ Nenhuma das associações testadas (CLIO-VRC, CLIO-NTM, CLIO-CPX, CLIO-TBF) foi capaz de remover os biofilmes de *Fusarium* spp..

- ✓ A associação entre CLIO-CPX removeu os biofilmes dos dermatófitos.
- ✓ O time-kill combination revelou que as associações CLIO-VRC e CLIO-CPX atuaram como fungicidas sobre as cepas de *Fusarium* spp., e a combinação CLIO-CPX foi fungicida para as espécies de dermatófitos.
- ✓ Nenhuma das associações (CLIO-VCR e CLIO-CPX) foram irritantes para a membrana córneo-alantóide.
- ✓ As associações demonstraram não ser citotóxicas para leucócitos humanos e demonstraram alto percentual de viabilidade celular, demonstrando ser seguras para o tratamento de ceratite e onicomicose.
- ✓ A nitroxolina demonstrou não ter atividade *in vitro* sobre a parede celular e membrana celular fúngica, contudo, demonstrou atuar sobre as enzimas alceno-1 monooxigenase e metionina aminopeptidase tipo 2.
- ✓ O complexo de espécies de *Fusarium graminearum* tem uma tendência a ser resistente ao carbamato de benzimidazol e sensibilidade aos triazóis, especialmente tebuconazol, além de aumento na expressão de micotoxinas na presença de fungicidas pertencentes a classe das estrobilurinas.
- ✓ O perfil de suscetibilidade foi reunido para 65 fungos frente a 20 agentes antifúngicos recomendados para as mais diversas micoses humanas, e embora haja um arsenal terapêutico disponível, nem todos os antifúngicos são eficazes na eliminação de todos os microrganismos fúngicos.

Finalmente, podemos concluir que o tratamento para as micoses humanas e agrícolas, como a fusariose no trigo é complexo e envolve a adoção de medidas que envolvem impedir ou amenizar a resistência aos mais diversos fungicidas agrícolas e clínicos. Também podemos concluir que a resistência adquirida no campo pela exposição a fungicidas agrícolas pode influenciar negativamente em tratamentos na clínica médica humana. Por fim, novas alternativas que visem a combinação entre

fármacos ou até mesmo o reposicionamento de fármacos existentes pode ser uma possibilidade para combater patógenos de difícil tratamento na clínica médica humana.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Aziz MM, Al-Omar MS, Mohammed HA, Emam TM. *In vitro* and *Ex Vivo* Antibiofilm Activity of a Lipopeptide Biosurfactant Produced by the Entomopathogenic *Beauveria bassiana* Strain against *Microsporium canis*. *Microorganisms*. 2020; 8(232):1-16.
- Al-Fattani MA, Douglas J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 2006;55:999–1008.
- Al-Hatmi AMS, Bonifaz A, de Hoog GS, Vazquez-Maya L, Garcia-Carmona K, Meis JF, Van Diepeningen AD. Keratitis by *Fusarium temperatum*, a novel opportunist. *BMC Infect. Dis*. 2014;14:588.
- Al-Hatmi Ams, Meis Jf, Hoog Gs. *Fusarium*: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. *PLOS Pathogens*. 12:1-8.
- Al-Hatmi MAS, Hagen F, Menken SBJ, Meis JF, Hoog S. Global molecular epidemiology and genetic diversity of *Fusarium*, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015. *Emerging Microbes & Infections*. 2016;5:1-11.
- Al-Hatmi AMS, Bonifaz A, Ranque S, Hoog GS, Verweij PE, Meis JF. Current antifungal treatment of fusariosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018; 51:326–332.
- Ahmadi B, Mirhendi H, Shidfar MR, Nouripour-Sisakht S, Jalalizand N, Geramishoar M, Shokoohi GR. A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. *Journal de Mycologie Médicale*. 2015;25:29-35.
- Amadasi S, Pelliccioli GF, Colombini P, Bonomini A, Farina C, Pietrantonio F, Pedroni P. Contact lens-related *Fusarium* keratitis : a case report. *Le Infez. Med*. 2017;2:166–8.
- American Academy of Microbiology.. One Health: Fungal Pathogens of Humans, Animals, and Plants. *American Society for Microbiology*. 2017:1-44.
- Andrade V, Rossi GAM. Dermatofitose em animais de companhia e sua importância para a Saúde Pública – Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2019;13:142-155.
- Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Di Bonaventura G, Hébraud M, Jaglic Z, Kačániová M, Knøchel S, Lourenço A, Mergulhão F, Meyer RL, Nychas G, Simões M, Tresse O, Sternberg C. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews In Microbiology*. 2017;43:313-351.
- Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* 1999;48:671–679.

Baldo A, Monod M, Mathy A, Cambier L, Bagut ET, Defaweux V, Symoens F, Antoine N, Mignon B. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*. 2012; 55:218–223.

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

Baran R, Tosti A, Piraccini BM. Uncommon clinical patterns of *Fusarium* nail infection: report of three cases. *Br. J. Dermatol.* 1997;136:424–7.

Bareggi SR; Cornelli U. Clioquinol: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18. 2012:41–46.

Batista BG, Chaves MA, Reginatto P, Saraiva OJ, Fuentefria AM. Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2020;53:1-7.

Benedict K, Jackson Br, Chiller T, Beer Kd. Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States. *Clin Infect Dis*. 2019;68:1791-1797.

Bernal M, Acharya N, Lietman T, Strauss E, McLeod S, Hwang D. We report a cluster of 4 cases of soft contact lens–associated. 2015;124:1051–3.

Bispo PJ, Haas W, Gilmore MS. Biofilms in infections of the eye. *Pathogens*. 2015;4:111-136.

Bongom, in F, Gago S, Oladele OR, Denining Wd. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi*. 2017;3:1-29.

Borghi E, Borgo F, Morace G. Fungal Biofilms: Update on Resistance. *Adv Exp Med Biol*. 2016;931:37-47.

Bourcier T, Sauer A, Dory A, Denis J, Sabou M. Fungal keratitis. *Journal français d'ophtalmologie*. 2017;40:307-313.

Breunig M, Chilvers MI. Baseline sensitivity of *Fusarium graminearum* from wheat, corn, dry bean and soybean to pydiflumetofen in Michigan, USA. *Crop Protection*. 2021;140:1-6.

Brilhante RSN, Correia EEM, Guedes GMM, Pereira VS, Oliveira JS, Bandeira SP, Alencar LP, Andrade ARC, Castelo-Branco DSCM, Cordeiro RA, Pinheiro AQ, Chaves LJQ, Neto WAP, Sidrim JJC, Rocha MFG. Quantitative and structural analyses of the *in vitro* and *ex vivo* biofilm-forming ability of dermatophytes. *Journal of Medical Microbiology*. 2017;66:1045–1052.

Brilhante RSN, Aguiar L, Sales JA, Araújo GS, Pereira VS, Pereira-Neto WA, Pinheiro AQ, Paixão GC, Cordeiro RA, Sidrim JJC, Bersano PRO, Rocha MFG, Castelo-Branco DSCM. *Ex vivo* biofilm-forming ability of dermatophytes using dog and cat hair: na ethically viable approach for an infection model. *Biofouling*. 2019; 35:392-400.

Carbona A, Parrino B, Cusimano MG, Spanó V, Montalbano A, Barraja P, Schillaci D, Cirrincione G, Diana P, Cascioferro S. New Thiazole Nortopsentin Analogues Inhibit Bacterial Biofilm Formation. *Marine Drugs*. 2018;16:1-15.

Chatterjee S, Das S. Developmental stages of biofilm and characterization of extracellular matrix of manglicolous fungus *Aspergillus niger* BSC-1. *Journal of Basic Microbiology*. 2019;1-12.

Cheikhrouhou F, Makni F, Neji S, Trigui A, Sellami H, Trabelsi H, Guidara R, Fki J, Ayadi A. Epidemiological profile of fungal keratitis in Sfax (Tunisia). *J Mycol Med*. 2014;24:308–312.

Chequi A, Roehrig R, Piton B, Luz MR, Deuner CC, Forcelini CA, Boller W. The combined use of spray volumes and droplet sizes in the chemical control of Asian soybean rust in cultivars with different leaf area indices. *Crop Protection*. 2020;136:1-7.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi— Second Edition: Approved Standard M38-A2. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

Córdova-Alcántara IM, Venegas-Cortés DL, Martínez-Rivera MA, Pérez NO, Rodríguez-Tovar. Biofilm characterization of *Fusarium solani* keratitis isolate: increased resistance to antifungals and UV light. *J Microbiol*. 2019;57(6):485–497.

Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Santos CT, Fusco-Almeida AM, Mendes-Gianini MJS. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling*. 2014;30(6):719-727.

Cruz AF, Hamel C, Yang C, Matsubara T, Gan Y, Singh AK, Kuwada K, Ishii T. Phytochemicals to suppress *Fusarium* head blight in wheat–chickpea rotation. *Phytochemistry*. 2012;78:72-80.

Dabas Y, Xess I, Singh G, Pandey M, Meena S. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Patterns of Clinical Dermatophytes Following CLSI and EUCAST Guidelines. *J. Fungi*. 2017;3(17):1-10.

Da Costa B, Pippi B, Kaminski TFA, Andrade SF, Fuentefria AM. *In vitro* antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. *Mycoses*. 2020;00:1–9.

Da Costa B, Pippi B, Berlitz SJ, Carvalho AR, ML Teixeira, IC Kulkamp-Guerreiro, SF Andrade, AM Fuentefria. Evaluation of activity and toxicity of combining clioquinol with ciclopirox and terbinafine in alternative models of dermatophytosis. *Mycoses*. 2021;64:727–733.

Dalla Lana DF, Batista BG, Alves SH, Fuentefria AM. Dermatophytoses: etiologic agents, clinical forms, therapy and new perspectives of treatment. *Clin Biomed Res.* 2016;36(4):230-41.

Danielli LJ, Lopes W, Vainstein MH, Fuentefria AM, Apel MA. Biofilm formation by *Microsporum canis*. *Clinical Microbiology and Infection* 2017;23:941-942.

De Chaves MA, Ferreira TA, Coutinho NMSR, Kaminski TFA, Teixeira ML, LFS Oliveira, Andrade SF, Fuentefria AM. Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. *Mycoses.* 2020; 63:1069–1082.

De Chaves MA, Reginatto P, Costa BS, Paschoal RI, Teixeira ML, Fuentefria AM. Fungicide Resistance in *Fusarium graminearum* Species Complex. *Current Microbiology.* *Curr Microbiol.* 2022. 7:1-9.

De Hoog, Dukik K, Monod M, Packeu M, Stubbe V, Hendrickx M, Kupsch C, Stielow Jb, Freeke J, Goker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Graser Y. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia.* 2017;182:5–31.

Diongue K, Ndiaye M, Seck MC, Diallo MA, Badiane AS, Ndiaye D. Onychomycosis Caused by *Fusarium* spp. in Dakar, Senegal: Epidemiological, Clinical, and Mycological Study. *Dermatology Research and Practice.* 2017:1-4

El-Sharkawy HHA, Abbas MS, Soliman AS, Ibrahim SA, El-Nady IAI. Synergistic effect of growth-promoting microorganisms on bio-control of *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi, growth, yield, physiological and anatomical characteristics of pea plants. *Pestic Biochem Physiol.* 2021;178:1-10.

Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds *Rev Iberoam Micol.* 2016;33(2):63–75.

Espinel-Ingroff A, Colombo AL, Cordoba S, Dufresne PJ, Fuller J, Ghannoum M, Gonzalez GM, Guarro J, Kidd SE, Meis JF, Melhem TMS, Pelaez T, Pfaller MA, Szesz MW, Takahaschi JP, Tortorano AM, Wiederhold NP, Turnidge J. International Evaluation of MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Value (ECV) Definitions for *Fusarium* Species Identified by Molecular Methods for the CLSI Broth Microdilution Method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2016;60(2):1079-1084.

Fan J, Urban M, Parker JE, Brewer HC, Kelly SL, Hammond-Kosack KE, Fraaije BA, Liu X, Cools HJ. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. *New Phytol.* 2013; 198(3):821-835.

Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews.* 2010;8:623-633.

Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, Schoenfeld D, Nomicos E, Park M, Kong HH, Segre JA. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. 2013;498:367-370.

Fuchs F, Hamprecht A. Susceptibility of carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) to nitroxoline. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:2934-2937.

Fuchs F, Hof H, Hofmann S, Kurzai O, Meis JF, Hamprecht A. Antifungal activity of nitroxoline against *Candida auris* isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(11):1-4.
Petrow V, Sturgeon B. Some quinoline-5: 8-quinones. *J Chem Soc*. 1954:570e4.

Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*; 2018;360:739–742.

Fuchs F, Wille J, Hamprecht A, Parcina M, Lehmann C, Chwarze-Zander C, Seifert H, Higgins PG. *In vitro* activity of mecillinam and nitroxoline against *Neisseria gonorrhoeae* re-purposing old antibiotics in the multi-drug resistance era. *J Med Microbiol*. 2019;68(7):991-995.

Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, Andrade SF. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett Appl Microbiol*. 2018;66(1):2-13.

Galletti J, Tobaldini-Valerio FK, Silva S, Kioshima ES, Trierveiler-Pereira L, Bruschi M, Negri M, Svidzinski TIE. Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. *Future Microbiology*. 2017;12:1311-1321.

Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC. 2016;59(3):145-50.

Gfeller, D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2013;29:3073–3079.

González-Ramírez AI, Ramírez-Granillo A, Medina-Canales MG, Rodríguez-Tovar AV, Martínez-Rivera MA. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. *BMC Microbiology*. 2016;16:1-13.

Ghannoum MA, Mukherjee PK, Warshaw EM, Evans S, Korman NJ, Tavakkol A. Molecular analysis of dermatophytes suggests spread of infection among household members. *Cutis*. 2013;91:237-245.

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

Gupta AK, Venkataraman M. Antifungal resistance in superficial mycoses. *Journal of dermatological treatment*. 2021;16:1-25.

Harding M, Marques LLR, Howard RJ, Olsen M. Can filamentous fungi form biofilms? Trends in Microbiology. 2009;17(11):475-480.

Heidary F, Gharebaghi R. Ivermectin: a systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen. The Journal of Antibiotics. 2020;73:593–602.

Helma C. Lazy structure-activity relationships (lazar) for the prediction of rodent carcinogenicity and *Salmonella mutagenicity*. Molecular Diversity (2006) 10: 147–158.

Herkert PF, Al-Hatmi AMS, Salvador GLO, Muro MD, Pinheiro RI, Nucci M, Queiroz-Telles F, Hoog GS, Meis JF. 2019. Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility of Clinical *Fusarium* Species From Brazil. Frontiers in Microbiology. 2019;10:1-11.

Hofgaard IS, Seehusen T, Aamot HU, Riley H, Razzaghian J, Le VH, Hjelkrem AGR, Dill-Macky R, Brodal G. Inoculum Potential of *Fusarium* spp. Relates to Tillage and Straw Management in Norwegian Fields of Spring Oats. Front. Microbiol., 2016;7:1-15.

Hoffman JJ, Burton MJ, Leck A. Mycotic Keratitis — A Global Threat from the Filamentous Fungi. Journal of Fungi. 2021;7(273):1-36.

Homa M, Shobana CS, Singh YR, Manikandan P, Selvam KP, Kredics L, Narendran V, Vagvolgyi C, Galgoczy L. *Fusarium* keratitis in SouthIndia: causative agents, their antifungal susceptibilities and a rapid identification method for the *Fusarium solani* species complex. Mycoses; 2013;56:501–511.

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

Jairajpuri DS, Hussain A, Nasreen K, Mohammad T, Anjum F, Rehman MT, Hasan GM, Alajmi MF, Hassan MI. Identification of natural compounds as potent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using combined docking and molecular dynamics simulations. Saudi Journal of Biological Sciences. 2021;28(4):2423–2431, 2021.

Janbon G, Quintin J, Lanternier F, D'enfert C. Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. Microbes and Infection. 2019;21:237-245.

Ježíková Z, Pagáč T, Víglas J, Pfeiferová B, Šoltys K, Bujdáková H, Černáková L, Olejníková P. Synergy Over Monotherapy Current Microbiology. 2019;76:673–677.

Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination Antifungal Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004;48(3):1-23.

Jourdana JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P. Drug repositioning: a brief overview. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2020;17:1-7

Kaminsk TFA, Dalla Lana DF, Quintana LD, Schmitt EG, Kaminski TA, Paula FR, Fuentefria AM, Machado MM, Oliveira LFS. Fumonisin B1 induces toxicity in human leukocytes at low concentrations: Are computational studies effective to determine biosafety? *Toxicol.* 2020;182:7-12.

Kano R, Hsiao Y, Siew HH, Chen C, Hasegawa A, Kamata H. Resistance Mechanism in a Terbinafine-Resistant Strain of *Microsporum canis*. *Mycopathologia.* 2018;183(3):629.

Kaur S, Singh S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. 2014;52:2–9.

Khan SA, Shahid S, Mahmood T, Lee CS. Contact lenses coated with hybrid multifunctional ternary nanocoatings (Phytomolecule-coated ZnO nanoparticles:Gallic Acid:Tobramycin) for the treatment of bacterial and fungal keratitis. *Acta Biomaterialia.* 2021;128:262-276.

Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology* 2017;15:740-755.

Kowalskia CH, Morellia KA, Schultza D, Nadellb CD, Cramera RA. Fungal biofilm architecture produces hypoxic microenvironments that drive antifungal resistance. *PNAS.* 2020;117:22473–22483.

La Fleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006;50(11):3839–3846.

Lagunin, A, Stepanchikova A, Filimonov D, Poroikov V. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatics.* 2000;16(8):747-748, 2000.

Lainhart W. *Fusarium* spp., a Genus of Common Plant Pathogens That Can Cause Devastating, Opportunistic Human Disease. *Clinical Microbiology.* 2018;40:1-5.

Lang EAS, Bitencourt TA, Peres NTA, Lopes L, Silva LG, Cazzaniga RA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. The *stuA* gene controls development, adaptation, stress tolerance, and virulence of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiological Research.* 2015;241:1-13

Lehrer S, Rheinstein PH. Ivermectin Docks to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-binding Domain Attached to ACE2. *In vivo.* 2020;34:3023-3026.

Leher S, Rheinstein PH. Ivermectin Docks to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-binding Domain Attached to ACE2. *In vivo.* 2020;34:3023-3026.

Leung AKC, Lam JM, Leong KF, Hon KL, Barankin B, Leung AAM, Wong AHC. Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery.* 2020;14(1):32-45.

Li J, Cornelissen B, Rep M. Host-specificity factors in plant pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 2020;144:1-11.

Li L, Liu X, Yang W, Xu F, Wang W, Feng L, Bartlam M, Wang L. Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *Journal of molecular biology*. 2008;376(2):453–465.

Lipner SR, Scher RK. Onychomycosis Clinical overview and diagnosis. Lipner SR, Scher RK. *J Am Acad Dermatol* 2019;80:835-51.

Lionakis MS, Levitz SM. Host Control of Fungal Infections: Lessons from basic studies and human cohorts. *Annu. Rev. Immunol*. 2018;36:139-73.

Rosa PD, Heidrich D, Corrêa C, Scroferneker ML, Vettorato G, Fuentefria AM, Goldani LZ. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Fusarium* isolates in onychomycosis *Mycoses*. 2017;1–7.

Magan N. Fungi in extreme environments. In: Kubicek CP, Druzhinina IS, editors. *Environmental and microbial relationships*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007:85-103.

Mahmoudi S, Masoomi A, Ahmadikia K, Tabatabaei SA, Soleimani M, Rezaie S, Ghahvechian H, Banafsheafshan A. Fungal keratitis: An overview of clinical and laboratory aspects. *Mycoses*. 2018;61(12):916-930.

Mao X, Schimmer AD. The toxicology of Clotrimazole. *Toxicology Letters*. 2008;182:1-6

Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. *Mycopathologia*. 2017;182:215-227.

Mezzari A, Fuentefria AM. *Micologia no laboratório clínico – Barueri, SP: Manole, 2012.*

Mhatre S, Patravale V. Drug repurposing of triazoles against mucormycosis using molecular docking: A short communication. *Computers in Biology and Medicine*. 2021;136:1-4.

Montagner MGFF, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MMMF, Cruz IBM. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotype. *Toxicol In vitro*. 2010;24(5):1410-1416.

Monod M, Feuermann M, Salamin K, Fratti M, Makino M, Alshahni MM, Makimura K, Yamada T. *Trichophyton rubrum* Azole Resistance Mediated by a New ABC Transporter, TruMDR3. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;22;63(11):1-26.

Muhammad ZA, Farghaly TA, Althagafi I, Al-Hussain SA, Zaki MEA, Harras MF. Synthesis of antimicrobial azoloazines and molecular docking for inhibiting COVID-19. *J Heterocyclic Chem*. 2021;58:1286–1301.

Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols. *PLoS Pathog.* 2018,18:14(10):e1007301.

Munkvold Gp. 2017. *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology.* 2017;1542:1-56.

Najafzadeh Mj, Dolatabadi S, Hoog S, Esfahani Mk, Haghani I, Aghili Sr, Ghazvini Rd, Rezaei-Matehkolaei, A, Abastabar M, Al-Hatmi Ams. Phylogenetic Analysis of Clinically Relevant *Fusarium* Species in Iran. *Mycopathologia.* 2020;185:515-525.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2003;52:1.

Oechsler RA, Feilmeier MR, Miller D, Shi W, Hofling-Lima AL, Alfonso EC. *Fusarium* keratitis: genotyping, *in vitro* susceptibility and clinical outcomes. *Cornea* 2013;32:667–673.

OECD. Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q) SAR] Models. 2007. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264085442-en.pdf?expires=1594151718&id=id&accname=ocid54025470&checksum=619CF74010F85CA56FEB63A80BD5D454>. Accessed March 15, 2020.

Ortega-Carrasco E, Lledós A, Maréchal JD. Assessing protein–ligand docking for the binding of organometallic compounds to proteins. *Journal of computational chemistry.* 2014;35(3):192-198.

Pappalardo F, Russo G, Tshinanu FM, Viceconti M. *In vitro* clinical trials: concepts and early adoptions. *Briefings in Bioinformatics,* 2018;1–10.

Piñero J, Furlong L, Sanz F. *In vitro* models in drug development: where we are. *Current Opinion in Pharmacology.* 2018;42:111-121

Perrins N, Bond R. Synergistic inhibition of the growth *in vitro* of *Microsporum canis* by miconazole and chlorhexidine. *Vet Dermatol.* 2003;14(2):99-102.

Pinto SML, Rivera Y, Sandoval LVH, Lizarazo JC, Rincón JJ, Méndez YV. Semi synthetic eugenol derivatives as antifungal agents against dermatophytes of the genus *Trichophyton*. *Jornal de microbiologia médica.* 2019;67:1-9.

Pippi B, Reginatto P, Machado GRM, Bergamo VZ, Dalla Lana DF, Teixeira ML, Franco LL, Alves RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Medical Mycology.* 2017; 55:763–773.

Pippi B, Machado GRM, Bergamo VZ, Alves RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. Clioquinol is a promising preventive morphological switching compound in the treatment of *Candida* infections linked to the use of intrauterine devices. *Journal of Medical Microbiology* 2018;67:1655–1663.

Pippi B, Joaquim AR, Lopes W, Machado GRM, Bergamo VZ, Giuliani LM, Abegg MA, Cruz L, Vainstein MH, Fuentefria AM, Andrade SF. 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonamides are promising antifungal candidates for the topical treatment of dermatomycosis. *Journal of Applied Microbiology*. 2019;128:1038-1049.

Pippi B, Lopes W, Reginatto P, Silva FEK, Joaquim AR, Alves RJ, Silveira GP, Vainstein MH, Andrade SF, Fuentefria AM. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharm J*. 2019;27(1):41-48.

Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Guilliams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(1):41-58.

Qi J, Cheng L, Sun Y, Hirata Y, Ushida N, Ma Z, Osada H, Nishikawa T, Xiang L. Identification of a asexual reproduction inducer of phytopathogenic and toxigenic *Fusarium*. *Angew.Chem.Int.Ed*. 2018;57:8100-8104.

Raies AB, Bajic VB. *In vitro* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Comput Mol Sci*. 2016;6:147-172

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*. 2009;35:340–355.

Ranawaka RR, Nagahawatte A, Gunasekara TA. *Fusarium* onychomycosis: Prevalence, clinical presentations, response to itraconazole and terbinafine pulse therapy, and 1-year follow-up in nine cases. *Int. J. Dermatol*. 2015;54:1275–82.

Ribas ADR, Spolti P, Del Ponte EM, Donato KZ, Schrekker H, Fuentefria AM. Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review. *Brazilian Journal of Microbiology*; 2016;47:793–79.

Rosa PD, Ramirez-Castrillon M, Borges R, Aquino V, Fuentefria Am, Goldani LZ. Epidemiological aspects and characterization of the resistance profile of *Fusarium* spp. in patients with invasive fusariosis. *Journal of Medical Microbiology*. 2019;10:1-8.

Robert VA, Casadevall A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *J Infect Dis*. 2009;200:1623-1626.

Rouzaud C, Lanternier F, Puel A. Primary immunodeficiencies and dermatophytosis. In: Carvalho A, eds. *Immunogenetics of Fungal Diseases*. (ed) Springer, 2019;121-133.

Ross IL, Weldhagen GF, Kidd SE. Detection and identification of dermatophyte fungi in clinical samples using a commercial multiplex tandem PCR assay. *Pathology*. 2020;52(4):473–477.

Santos DA, Hamdan JS. *In vitro* antifungal oral drug and drug-combination activity against Onychomycosis causative dermatophytes. *Med Mycol*. 2006;44(4):357-362.

Santos HL, Lang EAS, Segato F, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Terbinafine resistance conferred by multiple copies of the salicylate 1- monooxygenase gene in *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol*. 2018;56(3):378–381.

Sharma I. Phytopathogenic fungi and their biocontrol applications. *Toxins*. 2021;13:1-3.

Shousha MA, Santos ARC, Oechsler RA, Iovieno A, Maestre-Mesa J, Ruggeri M, Echegaray JJ, Dubovy SR, Perez VL, Miller D, Alfonso EC, Bajenaru ML. A novel rat contact lens model for *Fusarium* keratitis. *Mol Vis*. 2013;27(19):2596-605.

Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

Silva NM, Gentz CB, Reginatto P, Fernandes THM, Kaminski TFA, Lopes W, Quatrin PM, Vainstein MH, Abegg MA, Lopes MS, Fuentefria AM, Andrade SF. 8-Hydroxyquinoline 1,2,3-triazole derivatives with promising and selective antifungal activity. *Medical Mycology*. 2020;1–10.

Singh TU, Parida S, Lingaraju MC, Kesavan M, Kumar D, Singh RK. Drug repurposing approach to fight COVID-19 *Pharmacological Reports*. *Pharmacol Rep*. 2020;72(6):1479-1508.

Shih HP, Zhang X, Aronov AM. Drug discovery effectiveness from the standpoint of therapeutic mechanisms and indications. *Nature reviews. Drug discovery*. 2018;17(1):78.

Soares A, Alexandre K, Lamoureux F, Lemée L, Caron F, Pestel-Caron M, Etienne M. Efficacy of a ciprofloxacin/amikacin combination against planktonic and biofilm cultures of susceptible and low-level resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(11):1-8.

Son H, Kim M, Chae S, Lee Y. FgFibD Regulates Hyphal Differentiation Required for Sexual and Asexual Reproduction in the Ascomycete Fungus *Fusarium graminearum*. *Journal of Microbiology*. 2014;52:930-939.

Su H, Packeu A, Ahmed Sa, Al-Hatmi Ams, Blechert O, Ilkit M, Hagen F, Graser Y, Liu W, Deng S, Hendrickx M, Xu J, Zhu M, Hoog S. Distinction in the *Trichophyton rubrum* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019;57:1-14.

Szaliński M, Zgryźniak A, Rubisz I, Gajdzis M, Kaczmarek R, Przędziecka-Dołyk J. *Fusarium* Keratitis—Review of Current Treatment Possibilities. *J. Clin. Med*. 2021;10(23):1-32.

Stapleton F, Edwards K, Keay L, Naduvilath T, Dart JKG, Brian G, Holden B. Risk Factors for Moderate and Severe Microbial Keratitis in Daily Wear Contact Lens Users. *Ophthalmology*. 2012;119:1516-21.

Stepanović S, Vučović D, Hola V, Hola V, Di Bonaventura G, Djuvicić S, Čirković I, Ruzická F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8): 891–9.

Taheri P. Cereal diseases caused by *Fusarium graminearum*: from biology of the pathogen to oxidative burst-related host defense responses. *Eur J Plant Pathol*. 2018;152:1–20.

Taj-Aldeen SJ. Reduced Multidrug Susceptibility Profile Is a Common Feature of Opportunistic *Fusarium* Species: *Fusarium* Multi-Drug Resistant Pattern. *J. Fungi*. 2017;10:18.

Taj-Aldeen SJ, Abdullah HS, Al-Hatmi MS, Hamed M, Theelen B, Van Diepeningen AD, Boekhout T, Flör CL. *In vitro* resistance of clinical *Fusarium* species to amphotericin B and voriconazole using the EUCAST antifungal susceptibility method. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016;85(4):438-443.

Tauber A, Müller-Goymann CC. Comparison of the Antifungal Efficacy of Terbinafine Hydrochloride and Ciclopirox Olamine Containing Formulations against the Dermatophyte *Trichophyton rubrum* in an Infected Nail Plate Model. *Mol. Pharmaceutics*. 2014;11:1991–1996.

Tupaki-Sreepurna A, Kindo Aj. *Fusarium*: The Versatile Pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2018;36:8-17.

Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, Van Diepeningen A, Caira M, Muñoz P, Johnson E, Meletiadis J, Pana ZD, Lackner M, Verweij P, Freiburger T, Cornely OA, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, Lanternier F, Pagano L, Skiada A, Akova M, Arendrup MC, Boekhout T, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Guinea J, Guarro J, De Hoog J, Hope W, Kathuria S, Lortholary O, Meis JF, Ullmann AJ, Petrikos G, Lass-Flörl G. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;3:27–46.

Vanzini Zago V, Manzano-Gayosso P, Hernandez-Hernandez F, Mendez-Tovar LJ, Gomez-Leal A, Lopez Martinez R. Mycotic keratitis in an eye care hospital in Mexico City. *Rev Iberoam Micol.* 2020;27:57–61. (In Spanish.)

Veiga FF, Castro-Hoshino LV, Sato F, Bombassaro A, Vicente VA, Mendes V, Baesso ML, Negri M, Svidzinski TIE. *Fusarium oxysporum* is an onychomycosis etiopathogenic agent. *Future Microbiol.* 2018;13:1745-1756.

Veiga FF, Castro-Hoshino LV, Sato F, Baesso ML, Silva S, Negri M, Svidzinski TIE. Characterization of a biofilm formed by *Fusarium oxysporum* on the human nails. *International Journal of Dermatology* 2021;61(12):1-8.

Vila TVM, Quintanilha NS, Rozental S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms *in vitro*. *Journal of Medical Microbiology*. 2015;64:1436–1449.

Zhang S, Ahearn DG, Stulting RD, Schwam BL, Simmons RB, Pierce GE, Crow AS. Differences Among Strains of the *Fusarium oxysporum*–*F. solani* Complexes in Their Penetration of Hydrogel Contact Lenses and Subsequent Susceptibility to Multipurpose Contact Lens Disinfection Solutions. *Cornea*. 2007;26(10):1249-1254.

Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim A, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM. Members of the *Fusarium solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;2186–2190.

Zhao B, He D, Wanh L. Advances in *Fusarium* drug resistance research. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2021;24:215–219.

Zhi H, Shen H, Zhong Y, Sang B, Lv W, Li Q, Liu Z, Xia X. Tinea capitis in children: A single-institution retrospective review from 2011 to 2019. *Mycoses*. 2021;64:550–554.

Zhuang H, Ding X, Gao F, Zhang T, Ni Y, Chang Q, Xu G. Optical coherence tomography features of retinal lesions in chinese patients with endogenous *Candida* endophthalmitis. *BMC Ophthalmology*. 2020;20:1-8.

Zobell CE, Anderson DQ. 1936. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biological Bulletin*. 71(2):324-342.

Zuravski L, Escobar TA, Schmitt EG, Amaral QDF, Paula FR, Duarte T, Duarte MMMF, Machado MM, Oliveira LFS, Manfredini V. Gamma-hexalactone flavoring causes DNA lesion and modulates cytokines secretion at non-cytotoxic concentrations. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2019;20:1-8.

Yang Z, Chen W, Wan Z, Song Y, Li R. Tinea Capitis by *Microsporum canis* in an Elderly Female with Extensive Dermatophyte Infection. *Mycopathologia*. 2021;186:299–305.

Yang X, Shi X, Chen W, Zhou Y, MS Lionakis, DP Kontoyannis, Liu W. First report of kerion (tinea capitis) caused by combined *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*. *Medical Mycology Case Reports*. 2020;29:5-7.

Yue X, Li Q, Wang H, Sun Y, Wang A, Zhang Q, Zhang C. An ultrastructural study of *Trichophyton rubrum* induced onychomycosis. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(532):1-8.

Xiao YY, Zhou YB, Chao JJ, Ma L. Successful treatment of tinea capitis caused by *Microsporum canis* in a 23-day-old newborn with itraconazole pulse therapy and a review of the literature. *Dermatol Ther*. 2021;34(5): e15078.

Xie SX, Huang WJ, Ma ZQ, Huang M, Hanzlik RP, Zhaung QY. Structural analysis of metalloform-selective inhibition of methionine aminopeptidase. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. 2006;62:425–432.

Walther G, Stasch S, Kaerger K, Hamprecht A, Roth M, Cornely OA, Geerling G, Mackenzie CR, Kurzai O, Von Lilienfeld-Toal M. Fusarium keratitis in Germany. *J Clin Microbiol.* 2017;55:2983–2995.

Wang K, Yan J, Dang W, Xie J, Yan B, Yan W, Sun M, Zhang B, Ma M, Zhao Y, Jia F, Zhu R, Chen WC, Wang R. Dual antifungal properties of cationic antimicrobial peptides polybia-MPI: Membrane integrity disruption and inhibition of biofilm formation. *Peptides.* 2014;56:22–29.

Weitzman I, Summerbell RC. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews.* 1995;8:240–259.

Wehbe M, Malhotra AK, Anantha M, Lo C, Dragowska WH, Dos Santos N, Bally MB. Development of a copper-clioquinol formulation suitable for intravenous use. *Drug Deliv Transl Res.* 2017;8(1):239–251.

Wille J, Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm.* 2020;1-10.

Wuyts J, Van Dijck P, Holtappels M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? *PLoS Pathog.* 2018;18(14):1-14.

Wijma RA, Huttner A, Koch BCP, Mouton JW, Muller AE. Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:2916e26.