

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Melissa Manfroi Dal Pizzol

Eficácia e segurança da cicloheximida como aditivo antifúngico no Optisol GS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas para obtenção do Título de Mestre em Medicina: Cirurgia. Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas para obtenção do Título de Mestre em Medicina: Cirurgia

Orientadora: Profa. Dra Diane Ruschel Marinho

2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Melissa Manfroi Dal Pizzol

Eficácia e segurança da cicloheximida como aditivo antifúngico no Optisol GS

Orientadora: Profa. Dra Diane Ruschel Marinho

2020

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor incondicional; pela dedicação incansável e inesgotável e por todos os ensinamentos. Tenho certeza que sou uma pessoa muito melhor pelo fato de ter sido premiada como filha de vocês.

À minha irmã Mariana que veio me ensinar o que é amizade e amor verdadeiro. Parceira de uma vida inteira; um verdadeiro presente Divino.

Ao meu marido, Ricardo, pela nossa parceria diária e constante. Meu grande parceiro de estudo e grande incentivador.

Aos meus filhos, Giovani e Isadora, que me permitiram aprender o que é amar incondicionalmente e a aprender o que realmente nos desafia.

À minha orientadora, Professora Dra. Diane Marinho, que sempre me ensinou e incentivou na minha caminhada oftalmológica.

Aos colegas que me ajudaram a tornar realidade esse desafio: Eduarda Freitas, Claudete Locatelli, Felipe Guareze, Alexandre Funtefria, Paula Reginatto e Gabriella da Rosa Monte Machado.

“Vision is the art of seeing what is invisible to others”.

Jonathan Swift

LISTA DE ABREVIações

TC: transplante de córnea

AABO: Academia Americana de Banco de Olhos

TP: transplante penetrante

EUA: Estados Unidos da América

AEBO: Associação Europeia de Banco de Olhos

CIM: concentração inibitória mínima

RC: razão de chances

IC: intervalo de confiança

DMEK: do inglês *Descemet membrane endothelial keratoplasty*

MRSA: do inglês *methicilin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* metilina-resistente)

CFM: concentração fungicida mínima

UFC: unidades formadoras de colônias

DCE: densidade de células endoteliais

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

MOPS: ácido morfolinopropanossulfônico

SUMÁRIO

Introdução	7
Referências da Introdução	10
Revisão da Literatura	12
Referências da Revisão	26
Hipótese e Justificativa	32
Objetivos	33
Artigo Original em Português	34
Artigo Original em Inglês	62

INTRODUÇÃO

A endoftalmite pós transplante de córnea (TC) é uma complicação rara, no entanto apresenta alta morbidade. Sua incidência varia entre 0,05% a 0,77%¹. A Associação Americana de Banco de Olhos (AABO) recentemente reportou uma tendência ao aumento da incidência de infecção fúngica após TC, além de referir o dobro de infecções fúngicas após transplantes endoteliais do que transplantes penetrantes (TP), embora não tenha sido estatisticamente significativo². Além disso, a percentagem de endoftalmites após TC atribuídas aos fungos em comparação às bacterianas cresceu de 10% em 1991 para 63% em 2010^{2,3}. As espécies de *Candida*, especialmente a *Candida albicans* e, em menor proporção, a *Candida glabrata*, têm sido responsáveis por praticamente todos os casos reportados de infecção fúngica pós TC nos Estados Unidos da América (EUA)¹.

Até o momento, não há comercialmente nenhum meio de preservação hipotérmico de córnea com adição de antifúngico. Além disso, os indicadores colorimétricos de contaminação microbiana não detectam a contaminação fúngica². O Optisol-GS (Bausch & Lomb Inc), um dos meios mais utilizados no mundo inteiro, contém suplementação dos antibióticos gentamicina e estreptomicina. A adição desses antibióticos por volta de 1990 fez a incidência de endoftalmite bacteriana declinar⁴.

Os estudos demonstram um risco relativo de ceratite fúngica 3 vezes maior do que aqueles provocados por ceratite bacteriana em córneas

preservadas por mais de 4 dias, podendo essa taxa ser maior quanto maior o tempo de preservação⁵.

O meio de cultura de órgãos comumente utilizado na Europa contém adição do antifúngico anfotericina B na concentração de 0,25µg/ml. Esse meio é mantido em temperatura de 30-37°C, sendo que alguns estudos demonstram uma taxa menor de contaminação e infecção fúngica pós-operatória quando utilizado a cultura de órgãos, quando comparado às práticas norte americanas de armazenamento em hipotermia de 2-8°C^{6,7}. Essas diferenças possivelmente são atribuídas à adição da anfotericina B nos meios de cultura de órgãos. De acordo com a Associação Europeia de Banco de Olhos (AEBO), a incidência de endoftalmite pós TP utilizando meio de armazenamento em hipotermia era de 0,56% comparado com apenas 0,012% utilizando cultura de órgãos⁸.

Ritterband et al.⁹ realizaram um estudo adicionando voriconazol (100 µg/mL) ao Optisol-GS demonstrando uma redução significativa das taxas de culturas positivas para fungos quando suplementado com esse antifúngico comparado com o Optisol-GS sem a adição de voriconazol (0 versus 7 de 533 culturas positivas; p=0.02). Layer et al.¹ testaram a adição de voriconazol em diferentes concentrações inibitórias mínimas (CIM), como descrito a seguir: CIM x1, CIM x 10, CIM x 25 e CIM x 50, com máximo de 50 µg/mL. Para a anfotericina B, os autores utilizaram as seguintes concentrações: CIM x 0,25, CIM x 0,5, CIM e CIM x 10. O voriconazol mostrou-se efetivo em todas as concentrações e não apresentou toxicidade ao endotélio. A anfotericina B nas

duas menores concentrações foi menos efetiva para *C. glabrata*, sendo que apresentou toxicidade endotelial nas duas maiores concentrações. De acordo com Layer et al.¹, uma possível explicação para a menor eficácia demonstrada pela anfotericina B frente às espécies de *Candida*, seria decorrente ao mecanismo de ação de cada fármaco. A anfotericina B é um poliênico considerado fungicida, enquanto que o voriconazol é um triazólico com ação fungistática frente a maioria das espécies de *Candida*.

Avaliando a necessidade da adição de um antimicrobiano com ação antifúngica ao meio de Optisol-GS, idealizaríamos uma substância de baixo custo, baixo potencial tóxico, menor potencial de resistência e alta efetividade. Baseado nessas condições foi vislumbrada a possibilidade do uso da cicloheximida. A cicloheximida é um antimicrobiano isolado a partir da bactéria *Streptomyces griseus* e que possui um amplo espectro de ação frente a diferentes bactérias e fungos¹⁰. Seu mecanismo de ação atua na redução da síntese proteica levando à inibição da síntese de DNA^{10,11}. Embora a morbidade de uma ceratite fúngica pós transplante seja alta, a AABO não acredita que a adição de um antifúngico seja justificada pelo seu alto custo, embora não existam estudos de custo-efetividade². Em virtude do baixo custo da cicloheximida e da sua suscetibilidade demonstrada frente à *Candida* spp. e fungos filamentosos, poderia haver benefício da adição desse antimicrobiano ao meio Optisol-GS, objetivando a diminuição da contaminação fúngica e da morbidade associada à sua infecção^{12,13}.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Layer N, Cevallos V, Maxwell AJ, et al. Efficacy and Safety of Antifungal Additives in Optisol-GS Corneal Storage Medium. *JAMA Ophthalmol.*2014; 132(7): 832-837.
2. Aldave AJ, Dematteo J, Glasser DB, et al. Report of the Eye Bank Association of America Medical advisory board subcommittee on fungal infection after corneal transplantation. *Cornea.*2013;32(2):149-154.
3. Hassan SS, Wilhelmus KR; Medical Review Subcommittee of the Eye Bank Association of America. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol.*2005;139(4):685-690.
4. Rymer S, Scarpi M, Kwitko S, Alves L. Comparação entre a eficácia antimicrobiana de três diferentes meios de preservação da córnea. *Arq Bras Oftalmol* 59:438-42, 1996.
5. Hassan SS, Wilhelmus KR. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol.* 2005;139:685-690.
6. Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues, II: preservation technique: warm versus cold storage. *Int Ophthalmol.* 2008;28(3):155-163.
7. Fontana L, Errani PG, Zerbinati A, Musacchi Y, et al. Frequency of positive donor rim cultures after penetrating keratoplasty using

- hypothermic and org-cultured donor corneas. *Cornea*. 2007;26(5):552-556.
8. European Eye Bank Association. Adverse outcomes. In:Directory. 11th ed. Brussels, Belgium:European Eye Bank Association;2003.
 9. Ritterband DC, Shah MK, Meskin SW, et al. Efficacy and safety of voriconazol as an additive in Optisol-GS: a preservation medium for corneal donor tissue. *Cornea*. 2007;26(3):343-347.
 10. Sullia SB, Maria R. Acquired cycloheximide resistance in *Neurospora crass* and *Sclerotium rolfsii*. *Proc Indian Acad Sci (Plant Sci)*, 1985. 95(6): 417-427.
 11. Siegel MR, Sisler HD. Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. *Biochim Biophys Acta*, 1964. 87:70-82.
 12. Milewski S, Mignini F, Prasad R, et al. Unusual susceptibility of multidrug-resistant yeast strain to peptidic antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001: 223-228.
 13. Angermayr K, Parson W, et al. Expression of *atrC*- encoding a novel member of the ATP binding cassette transporter family in *Aspergillus nidulans* – is sensitive to cycloheximide. *Biochimica et Acta* 1453.1999:304-310.

REVISÃO DA LITERATURA

Endoftalmite pós TC é uma complicação rara, mas devastadora com potencial de perda definitiva da acuidade visual. A incidência relatada pós TP varia de 0,08% a 1,05% ¹⁻². Em uma revisão sistemática da literatura, Taban M et al.⁴ estimaram uma incidência média de endoftalmite aguda de 0,382% baseado em 90549 TC penetrantes no período de 1972 a 2002. No entanto, relatam uma diminuição das taxas ao longo das décadas, sendo 0,392% entre os anos de 1972 a 1999 e 0,2% entre 2000 e 2003, representando uma queda de quase 2 vezes na sua incidência (RC 1.96; IC 95%: 1.01-3.8). Nesse estudo não foi avaliado a presença dos tipos de microrganismos envolvidos. Outro estudo do Reino Unido avaliou a incidência de endoftalmite em 11320 TP entre os anos de 1999 e 2006, encontrando uma incidência de 0,67% e sendo isolado o agente etiológico em apenas 13 casos (54%), dos quais 4 eram fungos. Os fatores associados ao aumento do risco de endoftalmite após análise multivariada foi a causa morte por septicemia ou infecção associada ao doador (RC 4.4, IC 95%: 1.8-10.8, $p < 0,001$), casos de alto risco incluindo pacientes com indicação por ceratite infecciosa, trauma ou úlcera corneana (RC 2.8, IC 95%: 1.6-5.0, $p < 0,0002$) ou outras indicações de transplante, como visual, cosmética ou terapêutica por infecção severa, perfuração iminente ou atual (RC 1.9, IC 95%: 1.2-3.1, $p < 0,007$), com uma sobrevida do enxerto em 5 anos de 27% nos casos que tiveram endoftalmite³.

A AABO reúne um banco de dados dos eventos adversos dos transplantes das córneas distribuídas pelos vários bancos de olhos dos EUA, sendo relatada uma incidência de endoftalmite de 0,028% no período de 2007 a 2014. Nessa série as endoftalmites foram mais prevalentes nos transplantes endoteliais (61%) quando comparados aos penetrantes (37%), esclerais (1%) e por ceratoprótese (1%), demonstrando uma significância clínica, embora não estatística ($p=0,098$). Além disso, a predominância das culturas positivas foi maior para fungo (65%) *versus* bactéria (35%), sendo que a incidência de infecção fúngica aumentou de 2:10.000 casos em 2007 para 16:10.000 em 2013 ($p<0,05$). O maior isolado fúngico foi a *Candida* spp. (65%). Os autores postulam que o aumento da incidência de fungo possa ser atribuída a ausência de adição de um antifúngico ao meio de preservação e ao maior tempo de preservação, em virtude do preparo dos transplantes endoteliais pelo banco de olhos ¹, diferentemente das publicações de locais como o Reino Unido em que as córneas são mantidas em meio de cultura de órgão que contém antifúngico³. Um estudo recente comparou a incidência de endoftalmite pós TC penetrante *versus* endotelial, sendo que o risco do penetrante foi 4 vezes maior que o endotelial (incidência 07% x 0,2% respectivamente), além de um risco de 8 vezes mais alto quando associado a vitrectomia anterior ou via pars plana. Os autores sugerem que essa incidência maior após TC penetrante possa estar associado aos

casos de piores prognósticos nesse grupo e com maior risco de infecção e de necessidade de vitrectomia⁴.

No continente americano, os meios de preservação de córnea predominantemente utilizados são os meios hipotérmicos. Até o presente, nenhum meio comercialmente disponível contém antifúngico. Apenas na década de 1990, o meio mais utilizado, Optisol (Bausch and Lomb, Rochester, Nova Iorque), teve adição dos antibióticos gentamicina e estreptomicina (a partir desse momento sendo denominado Optisol-GS) diminuindo a incidência de endoftalmite bacteriana pós-TC. Após a era do Optisol-GS, o risco relativo relatado de ceratite fúngica aumentou 3 vezes mais que o observado para infecção bacteriana nas córneas com mais de 4 dias de preservação⁵, provavelmente implicado pela diminuição das infecções bacterianas, inclusive a recomendação da AABO era de não utilizar córneas para TC endotelial com mais de 12 dias de preservação pelo maior risco de infecção fúngica⁶. Outro estudo do conselho consultivo da AABO relatou 34 casos de infecção fúngica em 221.664 TC entre anos de 2007 e 2010. Desses 34 casos relatados, a cultura foi positiva no doador em 3, no receptor em 12, em ambos em 16 e em 3 casos o diagnóstico foi pelo exame direto com achado de hifas. Microrganismos do gênero *Candida* foram os mais prevalentes, sendo a espécie *Candida albicans* relatada em 45%, seguida por *Candida glabrata*, em 35% dos casos. Dos 31 casos de culturas positivas, 15 foram em TC endotelial (0,022%), 14 em TC penetrante (0,012%) e 3 em TC lamelar anterior, mas

sem diferença estatística ($p=0076$). Embora esse estudo tenha algumas limitações em virtude dos dados serem reportados como efeitos adversos, podendo ter o viés de não serem notificados casos positivos, o achado mais importante evidenciado pelo estudo é de que aproximadamente 3/4 dos pares de córneas que causaram infecção no receptor tinham comprovação de cultura positiva no meio e 2/3 resultaram em infecção no receptor. Esses achados corroboram o fato de que um par de córneas contaminado por um doador colonizado por fungo pode implicar em infecção pós TC em 2 potenciais receptores. Esses achados fizeram o conselho consultivo da AABO aconselhar a suplementação com antifúngico nos meios de preservação ⁶.

Diferentemente dos EUA, os bancos de olhos europeus utilizam, na sua maioria, o meio de preservação de órgãos que pode ser mantido na temperatura de 28°C a 34°C por até 28 dias. Esse meio contém além dos antibióticos estreptomicina e penicilina G, o antifúngico anfotericina B. Ambos os meios (hipotérmicos e meios de cultura de órgãos) apresentam métodos colorimétricos para detecção de crescimento bacteriano. No entanto, estes métodos são menos confiáveis nos meios hipotérmicos. Um estudo comparou as incidências de infecções fúngicas de um banco de dados de 16.862 córneas distribuídas para TC endotelial providas de 16 bancos de olhos europeus, entre 2012 e 2017. Demonstrou uma taxa de 0,5% de infecção fúngica quando as córneas eram preservadas em meio hipotérmico, comparada com uma incidência de 0,02% quando preservada

em meio de cultura de órgãos ($p < 0,0001$)⁷. Além disso, os autores detalham os casos de infecção fúngica, evidenciando que dos 10 casos de infecção fúngica, 6 estariam relacionados a contaminação de 3 pares de halos córneo-esclerais. Isso corrobora o fato que quando há contaminação e infecção em um receptor, o par deveria receber profilaxia antifúngica pelo alto risco deste também estar contaminado e poder ocasionar infecção no seu receptor e além disso também sugerem a adição de antifúngico nos meios hipotérmicos^{7,8}.

As taxas de cultura positiva dos halos córneo-esclerais variam na literatura de 0% a 12% e são o principal fator preditor de endoftalmite pós TC, segundo um estudo com 100% de sensibilidade e 99% de especificidade⁹. A cultura positiva para fungo tem alto valor preditivo, pois aumenta em 247 vezes o risco de endoftalmite fúngica, em contraste com a cultura da córnea doadora positiva para bactéria que apresenta baixa correlação com ceratite ou endoftalmite bacteriana pós TC apesar da incidência elevada de positividade dos halos (12%-39%)^{8,10,11}. Visliser et al. avaliaram a incidência de cultura fúngica positiva nos halos corneanos e a incidência de ceratite e endoftalmite pós TC. Eles encontraram uma taxa de 2.1% de culturas positivas (71/3414), sendo a *Candida albicans* (26%), *Candida glabrata* (23.3%) e *Alternaria species* (11%) os agentes infecciosos mais prevalentes. Quatro dos pacientes que tiveram cultura positiva para fungo desenvolveram ceratite fúngica pós TC (3 pós transplante endotelial automatizado e 1 pós transplante lamelar anterior

profundo) mas nenhum desenvolveu endoftalmite ⁸. Nesse mesmo estudo a incidência de culturas positivas nas córneas utilizadas para transplante endotelial foi elevada, sendo que os 23 casos dos 26 halos positivos utilizados em TC endotelial denominado *Descemet membrane endotelial keratoplasty* (DMEK), incluindo os 3 casos que resultaram em ceratite fúngica foram preparados pelo banco de olhos. Esses achados corroboram os de Aldave e colaboradores que também relacionam uma maior taxa de infecção fúngica pós TC endoteliais ⁶. Os autores sugerem que ao preparar a córnea pelo banco de olhos o aumento da temperatura do botão faça aumentar a proliferação dos fungos e, também, aumentar a atividade dos antibióticos no meio de preservação promovendo um microambiente não competitivo para o crescimento fúngico. Portanto, eles sugerem utilizar as córneas antes de 4 dias de preservação em virtude do risco aumentado após esse período ^{5,8}. Por outro lado, Mathes et al. reportam os resultados de 12 anos de um único banco de olhos não achando correlação entre a incidência de infecções fúngicas quando o tecido era preparado pelo banco de olhos ou pelo cirurgião ¹². Um estudo chinês, com base de dados provinda de um mesmo banco de olhos, descreve seus achados utilizando um meio de preservação hipotérmico a 4°C semelhante ao Optisol-GS chamado de Eusol-C (Alchimia Srl, Itália). Esse meio, semelhante ao Optisol-GS, também tem adição apenas de antibiótico, contendo somente a gentamicina, diferentemente do Optisol-GS que contém gentamicina e estreptomicina. Os autores relatam uma

incidência de contaminação de 8,2% (1111/1348), sendo 75,7% bactérias (maior prevalência de gram negativas com *Acinetobacter* spp. liderando em 19,8% dos casos) e 24.3% de fungos (maior prevalência para *Candida* spp. em 9% dos casos). O risco de contaminação foi maior quanto maior o tempo de preservação: 8,3% no grupo de 0-7 dias, 10,3% de 15-21 dias e 15% com mais de 21 dias de preservação ¹³.

Os estudos que avaliaram a taxa de contaminação dos meios de cultura de órgãos referem uma incidência entre 1,8% a 19,4% dependendo da técnica de preservação da córnea e do método de descontaminação ¹⁴. Ling et al. encontraram em 6 anos (entre 2011 e 2017) uma taxa de 2,5% de contaminação (110 córneas de 4410) sendo 57,3% fungos, 21,8% bactérias e 20,9% germe não identificado. *Candida albicans* foi o microrganismo mais prevalente (34,54%) e representou 60,3% dos fungos identificados. As taxas de contaminação foram mais elevadas no verão (3,7%) e outono (3,4%) quando comparadas ao inverno (1,6%) e primavera (1,4%), representando um risco de 2,25 vezes maior no verão (IC 95% 1,16-4,34) e 1,98 maior no outono (IC 95% 1,05-3,71). Essa variação sazonal foi justificada pelos autores pela influência da umidade e temperatura na proliferação fúngica¹⁴.

Já existem estudos avaliando a eficácia e segurança da adição de alguns antifúngicos ^{15,16,17,18,19} e também de antibióticos frente a

Staphylococcus aureus metilina-resistente (MRSA)²⁰ em meios hipotérmicos.

Ritterband et al. ¹⁷ foram os primeiros a estudarem a adição do voriconazol (100 µg/ml) ao meio Optisol-GS. Eles avaliaram 3 aspectos: a redução da positividade das culturas para fungos nos halos corneanos utilizados em transplantes, sendo que eles dividiam o halo corneano em 2 partes e em uma adicionavam o voriconazol; a toxicidade endotelial do antifúngico; a estabilidade do voriconazol na solução e no meio de Optisol-GS. A taxa de culturas positivas no meio de Optisol-GS sem adição do voriconazol foi de 12,3% (66/533), sendo que desses 7 (10%) foram fungos, sendo as espécies *Candida glabrata* e *C. albicans* as mais prevalentes. Já nos halos com adição de voriconazol a taxa de positividade nas culturas foi de 11.1% (59/533), mas não houve nenhum crescimento fúngico, sendo estatisticamente significativa essa diferença (p=0.015). A toxicidade endotelial foi avaliada com corantes vitais de azul tripan 0,3% e alizarina vermelha 0,2%. O percentual de células não viáveis que coraram com os 2 corantes foi de 0,17% no grupo com adição do voriconazol e 0,22% sem a adição, não sendo estatisticamente diferente (p<0,05). No teste de estabilidade, a efetividade da suplementação do voriconazol na supressão do crescimento fúngico foi entre 6-7 dias.

Outros autores avaliaram a suplementação de voriconazol e anfotericina B em diferentes concentração no meio Optisol-GS¹⁵. A eficácia desses

antifúngicos foi testada em 20 frascos de Optisol-GS sendo dividido em 2 grupos; para o voriconazol foi dividido em: (1) CIM (1 µg/ml), (2) CIM x 10(10 µg/ml), (3) CIM x 25(25 µg/ml), (4) CIM x 50 (50 µg/ml). Para anfotericina B foram utilizadas as seguintes concentrações: (5) CIM x 0,25 (0,0625 µg/ml), (6) CIM x 0,5 (0,125µg/ml), (7) CIM (4 µg/ml), (8) CIM x 10 (40 µg/ml), 2 frascos (9 e 10) de Optisol-GS não suplementado, mas inoculado como controle positivo e como controle negativo não suplementado e sem inóculo. Os organismos utilizados e adicionados foram *C. albicans* no primeiro grupo e *C. glabrata* no segundo grupo. Em virtude da toxicidade da anfotericina B, as concentrações foram escolhidas abaixo da CIM. Para o voriconazol foram escolhidos valores acima da CIM por ter estudos de ausência de toxicidade, inclusive o trabalho de Ritterband et al. que adicionou CIM x 100 ao Optisol-GS. Nos dias 2, 7 e 14 foram retiradas uma alíquota de 1ml para cultura. No grupo o qual foi adicionado a espécie *C. albicans* ao voriconazol houve crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) semelhante em todas as concentrações do voriconazol e no grupo controle positivo. No grupo com a adição de *C. glabrata* houve uma redução de apenas 70% das UFC/mL não havendo relação com a dose. Já no grupo da anfotericina B, não houve crescimento de *C. albicans* em nenhuma concentração avaliada, e no grupo *C. glabrata* houve crescimento apenas nas menores concentrações (CIM x 0,25 e CIM x 0,5), mas reduzindo em 99% e 96% das UFC/mL, respectivamente. A segurança foi realizada através da

avaliação do endotélio por microscopia especular no dia 1, 7 e 14. E através dos corantes vitais de azul de tripan 0,4% e alizarina vermelha 0,5% conforme o protocolo de avaliação endotelial com corantes vitais descrito por Park et al.²¹. Ao ser comparado com o controle, houve apenas uma diminuição significativa da contagem celular do dia 0 ao dia 7 para a anfotericina B CIM x 10 ($p=0,04$), uma tendência na concentração de CIM x 1 ($p=0,07$) e para as demais concentrações no grupo do voriconazol não houve diferença significativa. O percentual de células não viáveis também foi significativo apenas para anfotericina B em CIM x 10 (78% anfotericina x 10% controle $p=0,02$). Esse estudo corrobora com o estudo que avaliou a efetividade da anfotericina B na concentração de 0,25 µg/mL utilizada amplamente nos bancos de olhos Europeus na suplementação do meio de cultura de órgãos¹⁴. Por outro lado, esse estudo é contraditório ao do Ritterband e colaboradores¹⁷ que demonstraram uma diminuição na incidência de culturas positivas nos halos corneanos, no entanto, esses autores utilizaram concentrações 2 x maior (100 µg/mL), o que poderia justificar essa diferença.

Brothers et al.¹⁸ relataram que, dos 6592 transplantes realizados em 2013, em 2623 (40%) foram realizados cultura e desses 89 (3,4%) tiveram cultura positiva. Em 32 dos 2623 (1,2%) cresceram fungos, sendo estatisticamente maior nos tecidos precortados (0,82%) em comparação com tecido não processado (0,17%) ($p>0,01$). A taxa global de infecção foi maior nos transplantes endoteliais (0,27%) comparados com outros

procedimentos (0,12%), sendo que todas as infecções pós transplantes endotelias foram fúngicas contra uma em cinco quando os transplantes eram penetrantes. A hipótese dos autores era de que essa diferença de infecção e contaminação nos transplantes endoteliais pudesse estar vinculada ao aumento da temperatura em virtude do preparo do tecido nas córneas pré cortadas. Assim, eles testaram a adição de dois antifúngicos, a caspofungina e o voriconazol ambos na concentração de 50 µg/mL em 2 esquemas diferentes de incubação e em temperatura ambiente, sendo inoculadas as espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Os achados demonstraram que, no regime de maior incubação à temperatura ambiente, aumentou significativamente o número de UFC/mL ($p < 0,05$), não havendo aumento significativo quando comparado com o regime de menor exposição à temperatura ambiente. A adição tanto da caspofungina quanto do voriconazol diminuiu o número de UFC/mL mas não chegou ao nível de serem considerados fungicidas, além de não apresentarem efetividades iguais frente às diferentes espécies de *Candida*. Os autores sugerem que a combinação de antifúngicos poderia ser uma estratégia para melhorar o desempenho da ação antifúngica, já que não foi observado um efeito fungicida.

Duncan et al. também testaram a eficácia e segurança da adição de anfotericina B em diferentes concentrações (0,06, 0,255 e 0,12 µg/mL). Embora todas as concentrações fossem capazes de eliminar o crescimento fúngico no período de 7 dias após serem adicionados ao

Optisol-GS, apenas a concentração de 0,255 µg/mL eliminou o crescimento fúngico nos primeiros 2 dias. Nenhuma concentração apresentou toxicidade endotelial. Os autores sugerem essa concentração como ideal, inclusive corroborando com a concentração utilizada pelos bancos de olhos europeus, nos quais existe a suplementação comercial dos meios de cultura de órgãos com anfotericina B em 0,25 µg/mL ¹⁹.

Um estudo recente testou a CIM e a concentração fungicida mínima (CFM) da anfotericina B. O diferencial deste estudo foi a inoculação das cepas de leveduras no meio de Optisol-GS contendo a córnea, mimetizando o microambiente e as condições da córnea doada pelos bancos de olhos. A CIM variou entre 1 a 2 µg/mL e a CFM entre 0,5 a 2 µg/mL. Segundos os autores, o fator de diluição não excede 1:2 entre a CIM e CFM, portanto, ambas concentrações são consideradas iguais¹⁶.

Em 1985, ainda na era do meio hipotérmico de preservação denominado McCarey-Kaufman, Kowalski et al. avaliaram a CIM, e a CFM da anfotericina B, natamicina, nistatina e clotrimazol além da toxicidade endotelial humana e em coelhos. Além disso, os autores também avaliaram o efeito sinérgico das combinações entre dois, três e quatro antifúngicos, sendo que a melhor ação antifúngica foi encontrada para a associação envolvendo os quatro fármacos na concentração 1/12 da CFM de cada isolado testado ²².

A adição de uma substância antimicrobiana a um meio, idealmente deveria apresentar as principais características: baixo custo, baixo potencial tóxico, menor potencial de resistência e alta efetividade. Baseado na necessidade de adição de uma medicação antifúngica ao meio Optisol-GS e nas características mencionadas acima foi vislumbrada a possibilidade do uso da cicloheximida junto ao meio de Optisol-GS. A cicloheximida é um antibiótico com significativa propriedade antifúngica. Ele é composto por um núcleo de dimetil ciclohexanona aderido a um anel de glutarimida^{23,24}. É produzido por algumas cepas de *Streptomyces griseus* produtora de estreptomicina e age inibindo a síntese de proteína²⁵.

A resistência adquirida pelos fungos é uma tendência importante que dificulta o sucesso da terapia clínica. Já existem várias evidências de resistência fúngica frente ao voriconazol e outros derivados azólicos no tratamento de úlceras fúngicas^{26,27,28,29}. A resistência fúngica está relacionada ao uso dos derivados azólicos na agricultura e também a capacidade mutagênica dos fungos. Embora já exista relatos de resistência frente a cicloheximida^{24,30,31}, ela tem se mostrado um agente eficiente para o tratamento de cepas mutagênicas resistentes a múltiplos fármacos³¹. Ainda não existem estudos avaliando sua eficácia e segurança no tratamento de úlceras fúngicas ou sua suplementação nos meios de preservação hipotérmicos. Além disso, seu custo é menor

quando comparado aos outros antifúngicos como voriconazol e anfotericina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Edelstein SL, DeMatteo J, Stoeger CG, MacSai MS, Wang CH. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on Adverse Reactions Reported from 2007 to 2014. *Cornea*. 2016;35(7):917-926A. doi:10.1097/ICO.0000000000000869
2. Taban M, Behrens A, Newcomb RL, Nobe MY, Mcdonnell PJ. Incidence of Acute Endophthalmitis Following Penetrating Keratoplasty. 2015;123(May 2005).
3. Chen JY1, Jones MN2, Srinivasan S3, Neal TJ4, Armitage WJ5 KSNOTAG and CO (OTAG AS 18). Endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2015;122(1):25-30. doi:doi:10.1016/j.ophttha.2014.07.038. Epub 2014 Sep 26.
4. Borkar DS, Wibbelsman TD, Buch PM, et al. Endophthalmitis Rates and Clinical Outcomes Following Penetrating and Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2019;205:82-90. doi:10.1016/j.ajo.2019.05.004
5. Hassan SS, Wilhelmus KR. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(4):685-690. doi:10.1016/j.ajo.2004.12.016
6. Aldave AJ, Dematteo J, Glasser DB, et al. Report of the eye bank association of America medical advisory board subcommittee on fungal infection after corneal transplantation. *Cornea*. 2013;32(2):149-154.

doi:10.1097/ICO.0b013e31825e83bf

7. Lau N, Hajjar Sesé A, Augustin VA, et al. Fungal infection after endothelial keratoplasty: Association with hypothermic corneal storage. *Br J Ophthalmol*. Published online 2018:1-4. doi:10.1136/bjophthalmol-2018-312709
8. Vislisel JM, Goins KM, Wagoner MD, et al. Incidence and Outcomes of Positive Donor Corneoscleral Rim Fungal Cultures after Keratoplasty. *Ophthalmology*. 2017;124(1):36-42. doi:10.1016/j.ophtha.2016.09.017
9. Wilhelmus KR, Hassan SS. The Prognostic Role of Donor Corneoscleral Rim Cultures in Corneal Transplantation. *Ophthalmology*. 2007;114(3):440-445. doi:10.1016/j.ophtha.2006.09.006
10. Mian SI, Aldave AJ, Tu EY, et al. Incidence and Outcomes of Positive Donor Rim Cultures and Infections in the Cornea Preservation Time Study. *Cornea*. 2018;37(9):1102-1109. doi:10.1097/ICO.0000000000001654
11. Borowsky CM, Wallau AD, Reetz A, Kwitko S, Rymer S, Locatelli CI. Contaminação de halos doadores córneo-esclerais em ceratoplastia penetrante no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(1):13-17. doi:10.1590/s0004-27492008000100003
12. Mathes KJ, Tran KD, Mayko ZM, Stoeger CG, Straiko MD, Terry MA. Reports of Post-keratoplasty Infections for Eye Bank-prepared and Non-Eye Bank-prepared Corneas. *Cornea*. 2019;38(3):263-267.

doi:10.1097/ico.0000000000001839

13. Li S, Zhong J, Tan Y, et al. Microbiological Screening of Hypothermic Preserved Donor Corneas in Keratoplasty. *Curr Eye Res.* 2019;0(0):1-8. doi:10.1080/02713683.2019.1616766
14. Ling MLH, Wells M, Petsoglou C, et al. Factors Affecting Corneal Organ Culture Contamination: A 6-year Study at the New South Wales Tissue Bank. *Cornea.* 2019;38(7):829-835. doi:10.1097/ICO.0000000000001936
15. Layer N, Cevallos V, Maxwell AJ, Hoover C, Keenan JD, Jeng BH. Efficacy and safety of antifungal additives in Optisol-GS corneal storage medium. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(7):832-837. doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.397
16. Tran D, Dhaliwal D, Kamyar R, Jhanji V. Effect of Optisol Supplementation With 0 . 255 m g / mL. 2019;38(7):901-904.
17. Ritterband DC, Shah MK, Meskin SW, et al. Efficacy and safety of voriconazole as an additive in Optisol GS: A preservation medium for corneal donor tissue. *Cornea.* 2007;26(3):343-347. doi:10.1097/ICO.0b013e31802d82e8
18. Brothers KM, Shanks RMQ, Hurlbert S, Kowalski RP, Tu EY. Association between fungal contamination and eye bank-prepared endothelial keratoplasty tissue - Temperature-dependent risk factors and antifungal supplementation of optisol-gentamicin and streptomycin. *JAMA Ophthalmol.* 2017;135(11):1184-1190.

- doi:10.1001/jamaophthalmol.2017.3797
19. Duncan K, Parker J, Hoover C, Jeng BH. The effect of light exposure on the efficacy and safety of amphotericin B in corneal storage media. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(4):432-436.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0008
 20. Li J, Feiz V, Vieira AC, Davis-Boozer D, Polage C. The safety and efficacy of linezolid and daptomycin as an additive in optisol-GS against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cornea.* 2012;31(5):551-558.
doi:10.1097/ICO.0b013e318226c6b3
 21. Park S, Fong AG, Cho H, et al. Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. *Cornea.* 2012;31(12):1476-1479.
doi:10.1097/ICO.0b013e31824d0dda
 22. Kowalski RP, Raj CVS, Stuart JC, Dunn DS. Antifungal Synergism: A Proposed Dosage for Corneal Storage Medium. *Arch Ophthalmol.* 1985;103(2):250-256. doi:10.1001/archopht.1985.01050020102030
 23. Kominek LA. Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: control mechanisms of cycloheximide biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1975;7(6):856-860. doi:10.1128/AAC.7.6.856
 24. Salkin IF, Hurd N. Quantitative evaluation of the antifungal properties of cycloheximide. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972;1(3):177-184.
doi:10.1128/AAC.1.3.177
 25. DEHOUX P, DAVIES J, CANNON M. Natural cycloheximide resistance in

- yeast: The role of ribosomal protein L41. *Eur J Biochem.* 1993;213(2):841-848. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17827.x
26. Venkatesh Prajna N, Krishnan T, Mascarenhas J, et al. The mycotic ulcer treatment trial: A randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(4):422-429. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.1497
27. Venkatesh Prajna N, Krishnan T, Rajaraman R, et al. Effect of Oral Voriconazole on Fungal Keratitis in the Mycotic Ulcer Treatment Trial II (MUTT II): A Randomized Clinical Trial Committees-Data and Safety Monitoring Committee: HHS Public Access Author manuscript. 2016;134(12):1365-1372. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.4096
28. Florcruz N, Evans, J. R. Medical interventions for fungal keratitis (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(4):1469-1493. doi:10.1002/14651858.CD004241.pub4.www.cochranelibrary.com
29. Venkatesh Prajna N, Lalitha P, Rajaraman R, et al. Changing azole resistance: A secondary analysis of the MUTT I randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(6):693-696. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0530
30. Bae JH, Sung BH, Sohn JH. Site saturation mutagenesis of ribosomal protein L42 at 56th residue and application as a consecutive selection marker for cycloheximide resistance in yeast. *FEMS Microbiol Lett.*

- 2018;365(8):1-6. doi:10.1093/femsle/fny066
31. De Souza CC, Pellizzon CH, Hiraishi M, Goldman MHS, Goldman GH. Isolation and characterisation of cycloheximide-sensitive mutants of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*. 1998;33(1):60-69. doi:10.1007/s002940050309
 32. Clinical and Laboratory Standards Institute C. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement - M27-S3. *Clin Lab Standars Inst - NCCLS*. Published online 2008.
 33. CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-; CLSI Document M27-A3.*; 2008.
 34. Fontana L, Errani PG, Zerbinati A, Musacchi Y, Pede B Di, Tassinari G. Frequency of positive donor rim cultures after penetrating keratoplasty using hypothermic and organ-cultured donor corneas. *Cornea*. 2007;26(5):552-556. doi:10.1097/ICO.0b013e3180415d7e
 35. Elisabeth P, Hilde B, Ilse C. Eye bank issues: II. Preservation techniques: Warm versus cold storage. *Int Ophthalmol*. 2008;28(3):155-163. doi:10.1007/s10792-007-9086-1

HIPÓTESE

Pergunta: O Optisol-GS suplementado com cicloheximida é seguro e eficaz para diminuir a concentração de leveduras?

JUSTIFICATIVA

1. Alto potencial de infecção fúngica no botão do receptor quando a córnea doada está contaminada com fungo.
2. Alta morbidade e perda do enxerto se houver infecção fúngica do receptor.
3. Ausência de suplementação antifúngica nos principais meios de preservação de córnea hipotérmicos utilizados no Brasil.

OBJETIVOS

PRINCIPAL

Avaliar a eficácia da adição da cicloheximida no meio de preservação de córnea Optisol GS a fim de obter uma diminuição do crescimento fúngico de diferentes espécies de *Candida*.

SECUNDÁRIOS

1. Avaliar o perfil de suscetibilidade antifúngica da cicloheximida frente a diferentes espécies de *Candida*;
2. Avaliar a estabilidade da cicloheximida com e sem o meio de preservação em diferentes concentrações da mesma
3. Avaliar a toxicidade endotelial corneana em diferentes concentrações da cicloheximida

ARTIGO ORIGINAL PORTUGUÊS

Eficácia e segurança da cicloheximida como aditivo antifúngico no Optisol GS

Melissa Manfroi Dal Pizzol^{a,b}; Diane Ruschel Marinho^{a,b}; Eduarda Correa Freitas^{a,b};

Claudete Inês Locatelli^b; Felipe Silva Guareze^b;

Paula Reginatto^c; Gabriella da Rosa Monte Machado^c;

Alexandre M. Fuentefria^c

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

^bHospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Título provisório: Cicloheximida como aditivo no Optisol_GS.

Resumo

Introdução: A incidência de infecção fúngica após transplante de córnea aumentou significativamente nos últimos anos, especialmente *Candida spp.* Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia e segurança da adição de cicloheximida no meio Optisol-GS na redução do crescimento de *Candida spp.*

Métodos: Estudo laboratorial *in vitro* que mediu o crescimento fúngico em 24 frascos de Optisol-GS sendo divididos em 6 grupos de 4 frascos cada, conforme: (1) CIM/2 cicloheximida, (2) CIM cicloheximida, (3) CIMx5 cicloheximida, (4) CIMx10 cicloheximida, a partir dos valores de CIM obtidos para cada cepa, (5) Optisol-GS não suplementado mais inóculo (controle positivo) e (6) Optisol-GS não suplementado e sem inóculo (controle negativo). Em cada grupo foi adicionado *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, exceto no controle negativo. A partir dos frascos Optisol-GS foram avaliados o crescimento fúngico, além da densidade e viabilidade das células endoteliais da córnea em diferentes concentrações de cicloheximida.

Resultados: No estudo de eficácia, todas as cepas mostraram uma redução no crescimento fúngico a partir do segundo dia em todas as concentrações avaliadas de Optisol-GS suplementado com cicloheximida, mesmo em concentrações subinibitórias (CIM / 2). Para *C. glabrata*, a contagem de colônias foi reduzida para 99%. No estudo de segurança, nenhuma evidência de toxicidade endotelial da córnea foi encontrada em qualquer concentração em comparação com o controle pareado.

Conclusão: A adição de cicloheximida ao Optisol-GS diminuiu o crescimento fúngico, demonstrando ação fungicida contra *C. glabrata* e ação fungistática contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Este medicamento não demonstrou toxicidade para o endotélio corneano nas diferentes concentrações testadas.

Palavras-chave: córnea, banco de olhos, infecção micótica, farmacologia.

Introdução

Embora a infecção fúngica após o transplante de córnea seja uma complicação rara, o alto impacto visual e a morbidade dessas infecções têm ocasionado estudos para avaliar a possibilidade de suplementação dos meios de preservação da córnea com antifúngicos^{1,2}. Atualmente, nenhum dos meios hipotérmicos de preservação comercialmente disponíveis contém qualquer agente de ação antifúngica e os indicadores colorimétricos de contaminação microbiana não detectam confiavelmente a contaminação fúngica³. A cultura de órgãos a 34 ° C é o método mais frequentemente usado para armazenamento corneano na Europa, enquanto nas Américas, o armazenamento hipotérmico a 4 ° C é a preferência da maioria dos bancos de olhos. Uma pesquisa envolvendo 16 bancos de olhos europeus, usando um banco de dados de 16.662 córneas distribuídas para ceratoplastia endotelial durante 5 anos a partir de 2012, comparou a incidência de infecção fúngica em diferentes meios. Como resultado, o estudo demonstrou uma taxa de infecção de 0,5% nos casos em que as córneas foram preservadas em meio hipotérmico, em comparação com uma incidência de 0,02% quando as córneas foram preservadas em meio de cultura de órgãos (p <0,0001)⁴. A diferença provavelmente é em virtude do meio de cultura de órgãos ter adição de anfotericina B 0,25 µg / ml em sua fórmula, diferentemente do meio hipotérmico, que não possui aditivo antifúngico⁴.

As espécies de *Candida*, em particular *Candida albicans* e *C. glabrata*, foram responsáveis por quase todos os casos relatados de infecção fúngica

após o transplante de córnea. Além disso, houve aumento desses microrganismos após ceratoplastia endotelial ¹⁻⁷. Em 2010, a Associação Americana de Banco de Olhos (AABO) criou um subcomitê para investigar o benefício da adição de suplementos antifúngicos aos meios de preservação de córnea nos Estados Unidos da América (EUA) ³. Esse subcomitê concluiu uma tendência crescente na incidência de infecções fúngicas pós-transplante. No entanto, a suplementação com antifúngicos não foi recomendada devido à falta de evidências suficientes sobre a eficácia, segurança e custo-benefício da suplementação antifúngica. Alguns estudos avaliaram a eficácia, segurança e estabilidade à luz da adição de anfotericina B e voriconazol em armazenamento hipotérmico em várias concentrações diferentes e encontraram toxicidade endotelial em alta concentração de anfotericina B e falta de efeito em baixa concentração de voriconazol ^{5,6}.

A cicloheximida é um antibiótico com propriedades antifúngicas significativas. É produzida por algumas cepas de *Streptomyces griseus* produtoras de estreptomicina e atua inibindo a síntese protéica ^{7,8}. A seleção da resistência fúngica é uma tendência importante e torna a terapia difícil. Já existem evidências de resistência ao voriconazol e outros derivados azólicos no tratamento de úlceras fúngicas ^{9,10}. A cicloheximida é eficaz para cepas mutagênicas resistentes a múltiplas drogas ¹¹, além da vantagem de ter baixo custo. Ainda não há estudos avaliando sua eficácia e segurança no tratamento de úlceras fúngicas ou sua suplementação em meios de preservação hipotérmicos. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia e segurança da

adição de cicloheximida ao meio Optisol-GS na redução do crescimento das principais espécies de *Candida spp.*

Materiais e métodos

Cepas fúngicas

Neste estudo três cepas de *Candida spp.* de relevância clínica foram testadas: *C. albicans* (CA MS2), *C. glabrata* (CG 05), e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). As cepas foram analisadas fenotipicamente por Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieux Vitek - Hazelwood, Missouri, EUA). Todas as cepas foram obtidas no acervo de micologia do Laboratório de Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil). A cepa padrão (ATCC 22019) foi obtida da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) e usada como controle.

Teste de sensibilidade a antifúngicos

A concentração inibitória mínima (CIM) das cepas fúngicas selecionadas para este estudo foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27-A3 12,13. As cepas *C. albicans* (CA MS2), *C. glabrata* (CG 05) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram testadas. A solução contendo cicloheximida foi preparada em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) pH 7,0 tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico; Dynamic, Diadema,

São Paulo, Brasil), duas vezes a concentração a ser testada, variando de 250 - 0,97 µg / ml). O inóculo fúngico foi preparado em solução salina estéril 0,85% (Dynamic; Diadema, São Paulo, Brasil), contendo cultura de células com 24 h de crescimento em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA - HiMedia, Índia) a 35 ° C. A suspensão fúngica foi ajustada para escala de 0,5 McFarland, aproximadamente 1,0 - 5,0 x 10⁶ CFU / ml, em um espectrofotômetro (GT220, Global Trade Technology) a 530 nm. Em seguida, duas diluições subsequentes, a 1:50 e 1:20, foram realizadas para obter uma concentração de células de aproximadamente 1,0 - 5,0 x 10³ CFU / ml. O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços. Após microdiluição da cicloheximida em meio RPMI 1640 na proporção de 1: 1, foi adicionado o inóculo fúngico. Da mesma forma, na proporção de 1: 1 o antifúngico foi adicionado às microplacas, resultando em uma concentração fúngica de 0,5 - 2,5 x 10³ UFC / ml em cada microplaca. As microplacas foram incubadas a 35 ° C por 48 h. Os valores de CIM foram determinados como as menores concentrações capazes de inibir 100% do crescimento visual do fungo. Os mesmos procedimentos foram realizados para testar o meio de preservação da córnea, Optisol-GS (Bausch and Lomb, U.S.A), este foi usado para substituir o meio RPMI 1640.

Estudo de Eficácia

Vinte e quatro frascos estéreis de Optisol-GS foram divididos em 6 grupos de 4 frascos cada. Cada grupo de 4 frascos foi criado da seguinte forma: (1) CIM / 2

cicloheximida (2) CIM cicloheximida, (3) CIMx5 cicloheximida, (4) CIMx10 cicloheximida, a partir dos valores de CIM obtidos para cada cepa, (5) Optisol-GS não suplementado como controle positivo (mais inóculo) e (6) Optisol-GS não suplementado como controle negativo (sem inóculo). Em cada grupo foi adicionado uma cepa de *Candida spp.*, exceto no controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata, totalizando 24 frascos. Neste estudo, *C. albicans* (CA MS2), *C. glabrata* (CG 05) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram testados. As cepas foram cultivadas em SDA por 24 h a 35 ° C. As colônias foram colhidas das placas e suspensas em água estéril para obter turbidez equivalente a 0,5 padrão de McFarland (1 - 5 x 10⁶ UFC / ml). Em seguida, as suspensões fúngicas foram diluídas para aproximadamente 2,5 x 10³ UFC / ml para os grupos 1 a 5. Todos os frascos de Optisol-GS foram refrigerados a 2 a 8 ° C de acordo com as recomendações do fabricante. Após 2, 7 e 14 dias de incubação, 1 ml de solução foi removido e alíquotas de 10 e 100 µL foram diluídas 1:10 com água estéril para minimizar qualquer transporte de cicloheximida. Em seguida, as amostras foram imediatamente retiradas de 1ml de solução e cultivadas em SDA. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 35 ° C por 36 h para posterior contagem de colônias fúngicas viáveis nas placas. A metodologia seguiu Layer e cols.¹⁴ com modificações.

O teste ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Dunnett foi realizado para avaliar a eficácia da redução de *Candida* nas diferentes concentrações de cicloheximida adicionadas ao Optisol e comparadas ao controle. P <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Estudo de Segurança

Cinco pares de córneas de doadores impróprios para transplante por sorologia positiva foram obtidos no Banco de Olhos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Dois pares de córneas foram usados para testar a cicloheximida em CIM e 3 pares para testar a concentração de cicloheximida em CIMx10. Aleatoriamente, por sorteio, a córnea selecionada foi colocada em Optisol-GS suplementado com cicloheximida, e a outra córnea do par foi colocada em Optisol-GS não suplementado como controle. Todas as córneas tiveram a densidade de células endoteliais (DCE) avaliada por microscopia especular (Konan KSS-EB10) no dia 0 e após 3 e 14 dias de suplementação com cicloheximida. O teste t pareado foi usado para comparar a alteração média no DCE entre os controles e Optisol-GS suplementado de 0, 3 e 14 dias. Para análises estatísticas, um valor conservador de uma perda de 500 células / mm² foi usado quando o DCE era indeterminado devido à incapacidade de visualizar quaisquer bordas celulares claras, o que foi considerado secundário a dano endotelial grave. A coloração de corante vital do endotélio da córnea do doador foi realizada em todas as córneas no dia 14. Os corantes usados foram 0,4% de azul de tripan (Sigma-Aldrich Corp), um corante vital que cora células endoteliais gravemente danificadas e mortas e 0,5% de vermelho de alizarina (GFS Chemical, Inc), que cora as bordas das células e áreas desnudas da membrana de Descemet. A coloração foi realizada com base em um protocolo publicado por Park e colegas¹⁵. Cada córnea do doador foi colocada em uma placa de cultura com o endotélio voltado para cima. O endotélio foi coberto com

várias gotas de azul de tripan 0,4% durante 60 segundos. O azul de tripan foi então gentilmente removido e a córnea foi lavada com solução salina tamponada com fosfato. A córnea foi então imersa em 0,5% de vermelho de alizarina por 90 segundos, seguido de enxágue com solução salina tamponada com fosfato. Uma trepanação de 8 mm foi usada para cortar a córnea central e então transferida para lâminas de microscópio com o endotélio voltado para cima. O endotélio foi examinado em microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Alemanha) com aumento de 200x, acoplado a uma câmera digital Olympus. Cinco fotografias de diferentes campos da córnea central e paracentral foram tiradas para cada córnea. Em cada fotografia, células viáveis e não viáveis (coradas com azul de tripan) foram contadas por dois examinadores cegos, e a porcentagem média de células não viáveis (o número de células de azul de tripan dividido pelo número total de células) foi calculada para cada córnea e cada examinador (Figura 1). O coeficiente de correlação intraclasse foi utilizado para avaliar se havia correlação de médias entre os dois examinadores. O teste t pareado foi usado para comparar a média dos 2 examinadores da porcentagem de células não viáveis (o número de células do azul de tripan dividido pelo número total de células) entre os controles e Optisol-GS suplementado.

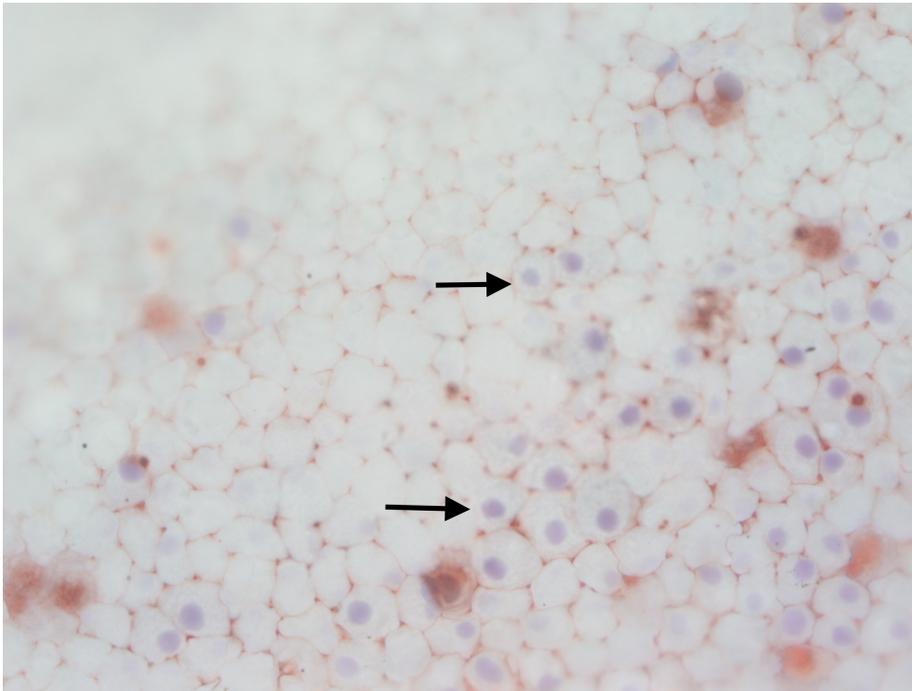


Figura 1. Endotélio corneano corado com azul de tripan 0,4% e vermelho de alizarina 0,5% (as setas indicam azul de tripan positivo).

Resultados

Dentre as espécies de *Candida* avaliadas, CA MS2, CG 05 e ATCC 22019 foram sensíveis à cicloheximida no meio RPMI e ao Optisol-GS suplementado com este antimicrobiano no tempo zero ($t = 0$), demonstrando valores de CIM entre 1,95 - 62,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ para ambas os meios. Após 14 dias ($t = 14$) de incubação em Optisol-GS suplementado com cicloheximida, houve um aumento nos valores de CIM deste fármaco contra todas as cepas testadas (CIM = 3,90 - 125 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Além disso, após 14 dias de incubação, a suplementação com cicloheximida em meios RPMI e Optisol-GS foi mais eficaz contra as cepas CG 05 e ATCC 22019 (CIM = 3,90 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (Tabela 1).

Tabela 1. Determinação dos valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{ml}$) para cicloheximida em meio RPMI e em Optisol-GS no tempo zero ($t = 0$) e após 14 dias de incubação ($t = 14$).

Cepas	Meio RPMI	Optisol-GS ^{t=0}	Optisol-GS ^{t=14}
CA MS2 ^a	62.5	62.5	125.0
CG 05 ^b	1.95	1.95	3.90
ATCC 22019 ^c	3.90	1.95	3.90

^a*Candida albicans*, ^b*C. glabrata*, ^c*C. parapsilosis*; CIM: Concentração Inibitória Mínima; Concentração da cicloheximida testada em meio RPMI e Optisol-GS: 250,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$; Meio RPMI: meio Roswell Park Memorial Institute 1640.

Estudo de eficácia

As três cepas sensíveis ao Optisol-GS suplementado com cicloheximida de *Candida spp.* (CA MS2, CG 05 e ATCC 22019) foram submetidas ao estudo de eficácia. Como resultado, todas as cepas apresentaram redução no crescimento das células fúngicas a partir do segundo dia de incubação em Optisol-GS suplementado com cicloheximida, em todas as concentrações avaliadas, mesmo em concentrações subinibitórias (CIM / 2) (Figura 2). Para a cepa CG 05 (Figura 2b), houve redução expressiva na contagem de colônias a partir do 2º dia. Essa redução tornou-se mais acentuada até o 14º dia,

principalmente nas concentrações de CIMx5 e CIMx10, em que a contagem de colônias foi reduzida em 99%. Para o CA MS2 (Figura 2a), houve redução do crescimento do fungo a partir do 2º dia, que se manteve constante até o 14º dia em todas as concentrações avaliadas. ATCC 22019 (Figura 2c) apresentou redução expressiva do crescimento a partir do 7º dia, permanecendo constante até o 14º dia, com redução de células viáveis variando entre 77 e 92%.

Para todas as cepas houve redução significativa do número de células viáveis em todas as concentrações de cicloheximida avaliadas quando comparadas ao controle não tratado ($P < 0,05$), demonstrando a eficácia desse fármaco contra *Candida*.

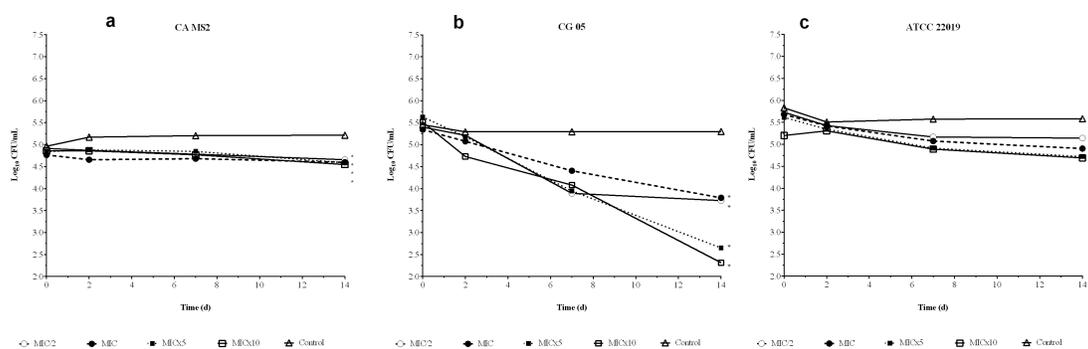


Figura 2: Gráfico de eliminação de tempo ou concentração de unidade formadora de colônia (CFU / ml) ao longo do tempo (0, 2, 7 e 14 dias) de: a) *C. albicans* (CA MS2), b) *C. glabrata* (CG 05) e c) *C. parapsilosis* (ATCC 22019) em Optisol-GS suplementado com cicloheximida em CIM/2, CIM, CIMx5 e CIMx10.O asterisco (*) significa que houve diferença estatística quando comprado com o controle sem tratamento ($p < 0.05$).

Estudo de Segurança

Houve uma redução na DCE do dia 0 ao dia 3 de suplementação e ao dia 14 em ambas as concentrações (CIM e CIMx10), mas não houve diferença na redução de DCE entre os controles e seus pares suplementado com antifúngico, conforme mostrado na Tabela 2 . A porcentagem de células endoteliais inviáveis, conforme determinado por coloração com corante vital, foi semelhante entre os controles e seus pares suplementados com antifúngico em ambas as concentrações (Tabela 2).

Tabela 2. Mudanças nas variáveis do estudo de segurança

Variáveis estudadas	Concentração inibitória mínima da cicloheximida (CIM)	
	CIM (µg/ml)	CIMx10 (µg/ml)
Média na DCE (DP) dia 0, Número de células		
Córnea suplementada	2483 (96)	2150 (1247)
Controle	2537 (164)	2816(212)
Valor P ^a controle x suplementado (95% IC)	0.818(-2283-2391)	0.410 (-2109-3443)
Média na DCE (DP) dia 3, Número de células		
Córnea suplementada	896 (560)	1632(1666)
Controle	500 (0)	1553(1125)
P valor ^a (95% IC)	0.500 (-5427-4635)	0.862 (-1796-1638)

Média na DCE (DP) dia 14, Número de células	500 (0)	1176 (739)
Córnea suplementada	500 (0)	1937 (1515)
Controle		0.232 (-1172-2695)
P valor ^a (95% IC)		
Média de células endoteliais não viáveis no14d, %	82 (8)	57(22)
Córnea suplementada	64 (42)	34 (16)
Controle	0.705 (-475-439)	0.352 (-106-60)
P valor ^a (95% IC)		
Média de células endoteliais viáveis no14d, %		
Córnea suplementada	18 (8)	42 (22)
Controle	36 (42)	66 (16)
P valor ^a (95% IC)	0.705 (-439-475)	0.352 (-60-106)

Abreviações: DCE, densidade de células endoteliais; DP, desvio padrão; 95% IC: intervalo de confiança de 95%

^a Cálculo usando o teste *t* pareado

Discussão

As infecções fúngicas pós-ceratoplastia aumentaram significativamente nos últimos anos ^{3,16,17,18}. Esse aumento de casos provavelmente está associado à ceratoplastia endotelial e os isolados mais comuns têm sido *Candida spp.*, principalmente *C. albicans* e *C. glabrata* ^{2,17}. O outro motivo para esse aumento pode ser o processamento do tecido da córnea, especialmente para os transplantes endoteliais, que requerem a retirada do tecido do meio de armazenamento e o aumento da temperatura do tecido. Além disso, alguns estudos associam um maior risco de infecção fúngica após o transplante endotelial quando o tecido foi preparado no banco de olhos em comparação com o tecido preparado na sala de cirurgia ^{2,3,4} ou com tecido preparado pelo cirurgião ¹. Os meios hipotérmicos de preservação de córnea são os meios mais comumente usados nos EUA e na América Latina. Nestes meios, a prevalência de casos de infecção fúngica foi 8 vezes maior do que a de infecção bacteriana, e a infecção fúngica foi mais provável quando os enxertos foram preparados a partir de córneas armazenadas em meio hipotérmico (0,5%) em comparação com a cultura de órgãos (0,02 %) ($p < 0,0001$) conforme demonstrado por Lau e et al ⁴. Outros trabalhos corroboram essas menores taxas de contaminação do tecido doador e de infecção pós-operatória quando os meios de cultura de órgãos foram usados ^{14,19,20}. Essas diferenças são possivelmente atribuídas à ausência de antifúngicos nos meios hipotérmicos. Ritterband et al. publicou o primeiro estudo sobre a adição de voriconazol (100 µg / ml) ao meio Optisol-GS. A taxa de culturas positivas no

meio Optisol-GS sem a suplementação de voriconazol foi de 12,3% (66/533), sendo 10% destas (7) representadas por fungos. *C. glabrata* e *C. albicans* foram as cepas mais prevalentes. Nos frascos com adição de voriconazol, a taxa de cultura de positividade foi de 11,1% (59/533), mas não houve crescimento fúngico, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,015$). A toxicidade endotelial foi avaliada com corantes vitais de azul tripan 0,3% e alizarina vermelha 0,2%. A porcentagem de células não viáveis coradas com os 2 corantes foi de 0,17% no grupo com adição de voriconazol e 0,22% sem adição, o que não foi significativamente diferente ($p < 0,05$). No teste de estabilidade, a eficácia da suplementação de voriconazol na supressão do crescimento fúngico foi entre 6-7 dias ⁶. Nosso estudo encontrou um gráfico de eliminação de tempo mais precoce que a do voriconazol, começando no segundo dia, especialmente, para *C. glabrata* e *C. albicans*. Para *C. parapsilosis*, esses achados ocorreram um pouco mais tarde, por volta do sétimo dia.

Outros autores avaliaram a suplementação de voriconazol e anfotericina B em diferentes concentrações no Optisol-GS ¹⁴. A eficácia de ambas as suplementações foi avaliada em 20 frascos de Optisol-GS e divididos em 2 grupos: (1) CIM voriconazol (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$), (2) CIM x 10 voriconazol (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$), (3) CIM x 25 voriconazol (25 $\mu\text{g} / \text{ml}$), (4) CIM x 50 voriconazol (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$), (5) CIM x 0,25 anfotericina B (0,0625 $\mu\text{g} / \text{ml}$), (6) CIM x 0,5 anfotericina B (0,125 $\mu\text{g} / \text{ml}$), (7) CIM anfotericina B (4 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e (8) CIM x 10 anfotericina B (40 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Foram utilizados dois frascos (9 e 10) contendo meio Optisol-GS inoculado

(controle positivo) e apenas meio Optisol-GS (controle negativo). O estudo testou duas cepas de *Candida spp.* (*C. albicans* e *C. glabrata*). Devido à conhecida toxicidade da anfotericina B, foram escolhidas concentrações abaixo da CIM. O voriconazol, por outro lado, foi escolhido acima da CIM devido a estudos que relataram ausência de toxicidade, incluindo o artigo de Ritterband et al ⁶ que adicionou CIMx100 ao Optisol-GS. No grupo que adicionou *C. albicans* ao voriconazol houve crescimento semelhante de unidades formadoras de colônias em todas as concentrações de voriconazol e no grupo controle positivo e no grupo que adicionou *C. glabrata* houve redução de apenas 70% de unidades formadoras de colônia, sem relação com a dose. No grupo da anfotericina B, não houve crescimento fúngico de *C. albicans* em nenhuma das concentrações testadas. Para *C. glabrata*, o crescimento do fungo ocorreu apenas nas concentrações mais baixas (CIMx0,25 e CIMx0,5), mas as unidades formadoras de colônias foram reduzidas em 99% e 96%, respectivamente. A segurança foi alcançada pela avaliação do endotélio por microscopia especular nos dias 1, 7 e 14, e pelos corantes vitais azul de tripan 0,4% e alizarina vermelha 0,5%, de acordo com o protocolo de avaliação endotelial com corantes vitais descrito por Park et al ¹⁵. Em comparação com o controle, houve apenas uma diminuição significativa na contagem das células fúngicas do dia 0 para o 7º dia com a anfotericina B na concentração de CIMx10 ($p = 0,04$) e uma tendência na CIM ($p = 0,07$). Por outro lado, nas demais concentrações e no grupo do voriconazol não houve diferença significativa. A porcentagem de células não viáveis também foi significativa

apenas na CIMx10 da anfotericina B (78% anfotericina B x 10% controle p = 0,02). Este estudo corrobora o estudo que avaliou a eficácia da anfotericina B a 0,25 µg / ml, amplamente utilizada em bancos de olhos europeus para suplementar o meio de cultura de órgãos ^{21,22}. Por outro lado, este estudo é contraditório ao de Ritterband et al.⁶, que demonstrou diminuição na incidência de culturas positivas dos halos corneanos quando suplementados com voriconazol. No entanto, esses autores utilizaram concentrações duas vezes maiores (100 µg / ml) que poderiam justificar essa diferença.

Em nosso estudo, a suplementação do meio Optisol-GS foi realizada com cicloheximida, um antimicrobiano com conhecida ação antifúngica, caracteristicamente barato e de ação rápida. No estudo de eficácia, observou-se redução do crescimento de células fúngicas a partir do 2º dia de incubação em meio Optisol-GS, em todas as concentrações avaliadas, mesmo em concentrações subinibitórias (CIM / 2). Para *C. glabrata* (CG 05) houve redução expressiva de 99% na contagem de colônias, no 14º dia nas concentrações de CIMx5 e CIMx10. Isso indica que a cicloheximida tem uma ação fungicida (definida como > 99% de redução na contagem de colônias) dependente da concentração e do tempo dessa cepa. Para *C. albicans* (CA MS2) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019), a cicloheximida apresenta ação apenas fungistática ao longo do tempo, pois foi observada redução inferior a 99% na contagem de colônias. Esses resultados demonstram a excelente atividade antifúngica da cicloheximida contra as principais cepas envolvidas em infecções fúngicas após o transplante de córnea, mesmo em concentrações

subinibitórias (CIM / 2). Nossos achados sugerem que o Optisol-GS suplementado com cicloheximida pode ter um desempenho melhor do que o Optisol-GS suplementado com voriconazol ou anfotericina B, particularmente para *C. glabrata*. Além disso, seu efeito antifúngico parece estar presente mesmo em concentrações mais baixas, superando os resultados do voriconazol ^{6,14}. E a ausência de toxicidade mesmo em concentrações mais elevadas, superando os achados da anfotericina B ^{5,14,22}.

Uma das principais limitações de nosso estudo é o tamanho da amostra de nossa avaliação de toxicidade e novos estudos devem ser realizados para fortalecer nossos achados. No entanto, nossos resultados sugerem um possível benefício na adição de cicloheximida ao meio Optisol-GS, considerando a alta morbidade de uma infecção fúngica após o transplante de córnea. Outra limitação do estudo é a não testagem das diferentes dosagens de cicloheximida usando levedura inoculada no tecido córneo-escleral em vez de levedura sozinha em meios de armazenamento para simular melhor o cenário realista. A espécie *Candida* parece criar um biofilme em células de mamíferos, tornando-se mais resistente a drogas azólicas e mais virulenta, explicando maiores culturas de leveduras positivas no Optisol-GS com o tecido córneo-escleral do que no Optisol-GS sozinho.

Como perspectivas futuras, sugerimos estudos que avaliem o sinergismo de dois fármacos com ação antifúngica para diminuir a concentração e a toxicidade de um único antifúngico como já sugerido por Kowalski e cols. ²³.

Conclusões

A adição da cicloheximida em Optisol-GS diminuiu significativamente a concentração de fungos do tipo levedura a partir do segundo dia de preservação. Este antifúngico também demonstrou ação fungicida contra *C. glabrata* e ação fungistática contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*. A adição de cicloheximida em diferentes concentrações no Optisol-GS não demonstrou toxicidade para o endotélio corneano mesmo em altas concentrações. Por sua ação rápida e baixo custo, a cicloheximida pode ser considerada um possível aditivo ao meio hipotérmico de preservação da córnea.

Referências

1. Edelstein SL, DeMatteo J, Stoeger CG, MacSai MS, Wang CH. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on Adverse Reactions Reported from 2007 to 2014. *Cornea*. 2016;35(7):917-926A. doi:10.1097/ICO.0000000000000869
2. Taban M, Behrens A, Newcomb RL, Nobe MY, McDonnell PJ. Incidence of Acute Endophthalmitis Following Penetrating Keratoplasty. 2015;123(May 2005).
3. Chen JY1, Jones MN2, Srinivasan S3, Neal TJ4, Armitage WJ5 KSNOTAG and CO (OTAG AS 18). Endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2015;122(1):25-30. doi:doi:

- 10.1016/j.ophtha.2014.07.038. Epub 2014 Sep 26.
4. Borkar DS, Wibbelsman TD, Buch PM, et al. Endophthalmitis Rates and Clinical Outcomes Following Penetrating and Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 2019;205:82-90. doi:10.1016/j.ajo.2019.05.004
 5. Hassan SS, Wilhelmus KR. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol.* 2005;139(4):685-690. doi:10.1016/j.ajo.2004.12.016
 6. Aldave AJ, Dematteo J, Glasser DB, et al. Report of the eye bank association of America medical advisory board subcommittee on fungal infection after corneal transplantation. *Cornea.* 2013;32(2):149-154. doi:10.1097/ICO.0b013e31825e83bf
 7. Lau N, Hajjar Sesé A, Augustin VA, et al. Fungal infection after endothelial keratoplasty: Association with hypothermic corneal storage. *Br J Ophthalmol.* Published online 2018:1-4. doi:10.1136/bjophthalmol-2018-312709
 8. Vislisel JM, Goins KM, Wagoner MD, et al. Incidence and Outcomes of Positive Donor Corneoscleral Rim Fungal Cultures after Keratoplasty. *Ophthalmology.* 2017;124(1):36-42. doi:10.1016/j.ophtha.2016.09.017
 9. Wilhelmus KR, Hassan SS. The Prognostic Role of Donor Corneoscleral Rim Cultures in Corneal Transplantation. *Ophthalmology.*

- 2007;114(3):440-445. doi:10.1016/j.opthta.2006.09.006
10. Mian SI, Aldave AJ, Tu EY, et al. Incidence and Outcomes of Positive Donor Rim Cultures and Infections in the Cornea Preservation Time Study. *Cornea*. 2018;37(9):1102-1109.
doi:10.1097/ICO.0000000000001654
 11. Borowsky CM, Wallau AD, Reetz A, Kwitko S, Rymer S, Locatelli CI. Contaminação de halos doadores córneo-esclerais em ceratoplastia penetrante no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(1):13-17. doi:10.1590/s0004-27492008000100003
 12. Mathes KJ, Tran KD, Mayko ZM, Stoeger CG, Straiko MD, Terry MA. Reports of Post-keratoplasty Infections for Eye Bank-prepared and Non-Eye Bank-prepared Corneas. *Cornea*. 2019;38(3):263-267.
doi:10.1097/ico.0000000000001839
 13. Li S, Zhong J, Tan Y, et al. Microbiological Screening of Hypothermic Preserved Donor Corneas in Keratoplasty. *Curr Eye Res*. 2019;0(0):1-8.
doi:10.1080/02713683.2019.1616766
 14. Ling MLH, Wells M, Petsoglou C, et al. Factors Affecting Corneal Organ Culture Contamination: A 6-year Study at the New South Wales Tissue Bank. *Cornea*. 2019;38(7):829-835. doi:10.1097/ICO.0000000000001936
 15. Layer N, Cevallos V, Maxwell AJ, Hoover C, Keenan JD, Jeng BH. Efficacy and safety of antifungal additives in Optisol-GS corneal storage

- medium. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(7):832-837.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.397
16. Tran D, Dhaliwal D, Kamyar R, Jhanji V. Effect of Optisol Supplementation With 0 . 255 m g / mL. 2019;38(7):901-904.
 17. Ritterband DC, Shah MK, Meskin SW, et al. Efficacy and safety of voriconazole as an additive in Optisol GS: A preservation medium for corneal donor tissue. *Cornea.* 2007;26(3):343-347.
doi:10.1097/ICO.0b013e31802d82e8
 18. Brothers KM, Shanks RMQ, Hurlbert S, Kowalski RP, Tu EY. Association between fungal contamination and eye bank–prepared endothelial keratoplasty tissue - Temperature-dependent risk factors and antifungal supplementation of optisol–gentamicin and streptomycin. *JAMA Ophthalmol.* 2017;135(11):1184-1190.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2017.3797
 19. Duncan K, Parker J, Hoover C, Jeng BH. The effect of light exposure on the efficacy and safety of amphotericin B in corneal storage media. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(4):432-436.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0008
 20. Li J, Feiz V, Vieira AC, Davis-Boozer D, Polage C. The safety and efficacy of linezolid and daptomycin as an additive in optisol-GS against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cornea.* 2012;31(5):551-558.
doi:10.1097/ICO.0b013e318226c6b3

21. Park S, Fong AG, Cho H, et al. Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. *Cornea*. 2012;31(12):1476-1479.
doi:10.1097/ICO.0b013e31824d0dda
22. Kowalski RP, Raj CVS, Stuart JC, Dunn DS. Antifungal Synergism: A Proposed Dosage for Corneal Storage Medium. *Arch Ophthalmol*. 1985;103(2):250-256. doi:10.1001/archopht.1985.01050020102030
23. Kominek LA. Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: control mechanisms of cycloheximide biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1975;7(6):856-860. doi:10.1128/AAC.7.6.856
24. Salkin IF, Hurd N. Quantitative evaluation of the antifungal properties of cycloheximide. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972;1(3):177-184.
doi:10.1128/AAC.1.3.177
25. DEHOUX P, DAVIES J, CANNON M. Natural cycloheximide resistance in yeast: The role of ribosomal protein L41. *Eur J Biochem*. 1993;213(2):841-848. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17827.x
26. Venkatesh Prajna N, Krishnan T, Mascarenhas J, et al. The mycotic ulcer treatment trial: A randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131(4):422-429.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.1497
27. Venkatesh Prajna N, Krishnan T, Rajaraman R, et al. Effect of Oral Voriconazole on Fungal Keratitis in the Mycotic Ulcer Treatment Trial II

- (MUTT II): A Randomized Clinical Trial Committees-Data and Safety Monitoring Committee: HHS Public Access Author manuscript. 2016;134(12):1365-1372. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.4096
28. Floracruz N, Evans, J. R. Medical interventions for fungal keratitis (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(4):1469-1493. doi:10.1002/14651858.CD004241.pub4.www.cochranelibrary.com
29. Venkatesh Prajna N, Lalitha P, Rajaraman R, et al. Changing azole resistance: A secondary analysis of the MUTT I randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134(6):693-696. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0530
30. Bae JH, Sung BH, Sohn JH. Site saturation mutagenesis of ribosomal protein L42 at 56th residue and application as a consecutive selection marker for cycloheximide resistance in yeast. *FEMS Microbiol Lett*. 2018;365(8):1-6. doi:10.1093/femsle/fny066
31. De Souza CC, Pellizzon CH, Hiraishi M, Goldman MHS, Goldman GH. Isolation and characterisation of cycloheximide-sensitive mutants of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*. 1998;33(1):60-69. doi:10.1007/s002940050309
32. Clinical and Laboratory Standards Institute C. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement - M27-S3. *Clin Lab Standars Inst - NCCLS*. Published online

- 2008.
33. CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-; CLSI Document M27-A3.*; 2008.
 34. Fontana L, Errani PG, Zerbinati A, Musacchi Y, Pede B Di, Tassinari G. Frequency of positive donor rim cultures after penetrating keratoplasty using hypothermic and organ-cultured donor corneas. *Cornea*. 2007;26(5):552-556. doi:10.1097/ICO.0b013e3180415d7e
 35. Elisabeth P, Hilde B, Ilse C. Eye bank issues: II. Preservation techniques: Warm versus cold storage. *Int Ophthalmol*. 2008;28(3):155-163. doi:10.1007/s10792-007-9086-1

SEÇÃO DE AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - EDITAL 04/2016 - PRONUPEQ 2016) pelo apoio financeiro e bolsas de pesquisa. Este estudo foi parcialmente financiado pela Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (AFIP) - Código Financeiro 001, e foi aprovado pelo comitê de ética em ciência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Informamos que o manuscrito foi submetido em nome de todos os autores e que se trata de uma pesquisa original não publicada anteriormente e que não está sendo considerada para publicação em outro lugar. Todos os autores declaram não ter conflito de interesses.

Contribuições dos autores:

Idealizou e projetou os experimentos: Melissa Manfroi Dal, Alexandre M. Fuentefria e Diane Ruschel Marinho.

Realizaram o experimento: Melissa Manfroi Dal Pizzol, Eduarda Correa Freitas e Paula Reginatto.

Analisaram os dados: Melissa Manfroi Dal Pizzol, Eduarda Correa Freitas, Gabriella da Rosa Monte Machado.

Contribuição com reagentes / materiais / ferramenta de análise: Claudete Inês Locatelli e Felipe Silva Guareze. Redação do artigo: Melissa Manfroi Dal Pizzol e Gabriella da Rosa Monte Machado.

ARTIGO ORIGINAL INGLÊS

Antifungal efficacy and safety of cycloheximide as an additive in Optisol-GS

Melissa Manfroi Dal Pizzol^{a,b}; Diane Ruschel Marinho^{a,b}; Eduarda Correa Freitas^{a,b};

Claudete Inês Locatelli^b; Felipe Silva Guareze^b;

Paula Reginatto^c; Gabriella da Rosa Monte Machado^c;

Alexandre M. Fuentefria^c

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^bHospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Running title: *Cycloheximide as an additive in Optisol-GS*

Abstract

Background: The incidence of fungal infection after corneal transplant has increased significantly in recent years, especially *Candida* spp. This study aimed to evaluate the efficacy and safety of the addition of cycloheximide in Optisol-GS media in decreasing the growth of *Candida* spp. strains.

Methods: An *in vitro* laboratory efficacy study measured fungal colony growth in 24 vials of Optisol-GS that were divided into 6 groups of 4 vials each, as follows: (1) MIC/2 cycloheximide, (2) MIC cycloheximide, (3) MICx5 cycloheximide, (4) MICx10 cycloheximide, from MIC values obtained for each strain, (5) unsupplemented Optisol-GS as a positive control (plus inoculum), and (6) unsupplemented Optisol-GS as a negative control (no inoculum). In each group was added *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, except in the negative control. Fungal colony growth was measured from the Optisol-GS vials, corneal endothelial cell density, and endothelial cell viability at different concentrations of cycloheximide.

Results: In the efficacy study, all strains showed a reduction in fungal cell growth from the second day at all evaluated concentrations of Optisol-GS supplemented with cycloheximide, even at subinhibitory concentrations (MIC/2). For *C. glabrata*, the colony count was reduced to 99%. In the safety study, no evidence of corneal endothelial toxicity was found at any concentration compared with the paired control.

Conclusion: The addition of cycloheximide to Optisol-GS decreased the fungal growth, demonstrating fungicide action against *C. glabrata* and fungistatic action against *C. albicans* and *C. parapsilosis*. This drug did not demonstrate toxicity to the corneal endothelium at different concentrations.

Keywords: cornea, eye banking, micotic infection, pharmacology.

Introduction

Although fungal infection after corneal transplantation is a rare complication, the high visual impact and morbidity of these infections have led to the study of the possibility of supplementation of corneal preservation media with antifungal drugs ^{10,18}. At present, none of the commercially hypothermic preservation media contain any antifungal action agent and the colorimetric indicators of microbial contamination do not consistently detect fungal contamination ⁶. Organ culture at 34°C is the most frequent method used for corneal storage in Europe, while in North America, hypothermic storage at 4°C is the preference of most eye banks. A survey involving 16 European eye banks, using a database of 16862 corneas distributed for endothelial keratoplasty over 5 years from 2012, compared the incidences of fungal infection. As a result, the study demonstrated an infection rate of 0.5% in the cases in which the corneas were preserved in hypothermic media, compared to an incidence of 0.02% when the corneas were preserved in organ culture media ($p < 0.0001$) ⁷. This difference is likely because the organ culture media has been added into the formula 0,25 µg/ml amphotericin B, which is different from the hypothermic media, which has no antifungal additive⁷.

Candida species, in particular *Candida albicans*, and *C. glabrata*, have accounted for nearly all reported cases of fungal infection after corneal transplantation. In addition, there was an increase in this microorganism after endothelial keratoplasty ¹⁻⁷. In 2010, the Eye Bank Association of America (EBAA) created a subcommittee to investigate the benefit of adding antifungal supplements to corneal storage media in the United States of America (USA) ⁶. This subcommittee concluded an increasing trend in the incidence of postkeratoplasty fungal infection. However, supplementation with

antifungals is not recommended because of the lack of sufficient evidence regarding the efficacy, safety, and cost-benefit of antifungal supplementation. Some studies evaluated the efficacy, safety, and light stability of amphotericin B and voriconazole addition in hypothermic storage at many different concentrations and found endothelial toxicity at a high concentration of amphotericin B and lack of effect at a low concentration of voriconazole ^{19,17}.

Cycloheximide is an antibiotic with significant antifungal properties. It is produced by some streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus* and acts by inhibiting protein synthesis ^{23,25}. Fungal resistance selection is an important trend and makes therapy difficult. There is already evidence of resistance to voriconazole and other azole derivatives in the treatment of fungal ulcers ^{29,28}. Cycloheximide is efficient for mutagenic strains resistant to multiple drugs ³¹, in addition to the advantage of having a low cost. There are still no studies evaluating its efficacy and safety in the treatment of fungal ulcers or its supplementation in hypothermic preservation media. This study aimed to evaluate the efficacy and safety of the addition of cycloheximide in Optisol-GS media in decreasing the growth of the main *Candida* spp. strains.

Material and methods

Fungal strains

In this study three *Candida* spp. strains of clinical relevance were tested: *C. albicans* (CA MS2), *C. glabrata* (CG 05) and *C. parapsilosis* (ATCC 22019). The strains

were analyzed phenotypically by Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieux Vitek - Hazelwood, Missouri, USA). All strains were obtained from the mycology collection of the Laboratory of Applied Mycology of the Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil). The standard strain (ATCC 22019) was obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and used as a control.

Antifungal susceptibility testing

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the fungal strains selected for this study was determined by the broth microdilution method, according to the M27-A3 protocol ^{32,33}. The *C. albicans* (CA MS2), *C. glabrata* (CG 05) and *C. parapsilosis* (ATCC 22019) strains were tested. The solution containing cycloheximide was prepared in RPMI 1640 media (Roswell Park Memorial Institute 1640; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pH 7.0 buffered with MOPS (morpholinopropanesulfonic acid; Dynamic, Diadema, São Paulo, Brazil), at twice the concentration to be tested, ranging from 250 - 0.97 µg/ml). The fungal inoculum was prepared in a 0.85% sterile saline solution (Dynamic; Diadema, São Paulo, Brazil), containing cell culture with 24 h of growth on Sabouraud Dextrose Agar (SDA - HiMedia, India) at 35°C. The fungal suspension was adjusted to 0.5 McFarland scale, approximately $1.0 - 5.0 \times 10^6$ CFU/ml, in a spectrophotometer (GT220, Global Trade Technology) at 530 nm. Then, two subsequent dilutions, at 1:50 and 1:20 were performed to obtain a cell concentration of approximately $1.0 - 5.0 \times 10^3$ CFU/ml.

The assay was performed on 96-well sterile polystyrene microplates. After microdilution of cycloheximide in RPMI 1640 media in a 1:1 ratio, the fungal inoculum

was added. Similarly, in a 1:1 ratio the antifungal agent was added to the microplates, resulting in a fungal concentration of $0.5 - 2.5 \times 10^3$ CFU/ml in each microplate. The microplates were incubated at 35°C for 48 h. The MIC values were determined as the lowest concentrations capable of inhibiting 100% of fungal visual growth. The same procedures were performed to test the corneal preservation media, Optisol-GS (Bausch and Lomb, U.S.A), this was used to replace the RPMI 1640 media.

Efficacy Study

Twenty four sterile vials of Optisol-GS were divided into 6 groups of 4 vials each. Each group of 4 vials was created as follows: (1) MIC/2 cycloheximide (2) MIC cycloheximide, (3) MICx5 cycloheximide, (4) MICx10 cycloheximide, from MIC values obtained for each strain, (5) unsupplemented Optisol-GS as a positive control (plus inoculum) and (6) unsupplemented Optisol-GS as a negative control (no inoculum). In each group was added a *Candida* spp. strain, except in the negative control. All experiments were performed in quadruplicate, totaling 24 vials.

In this study, *C. albicans* (CA MS2), *C. glabrata* (CG 05), and *C. parapsilosis* (ATCC 22019) were tested. The strains were grown on SDA for 24 h at 35°C. Colonies were harvested from the plates and suspended in sterile water to obtain turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard ($1 - 5 \times 10^6$ CFU/ml). Then, the fungal suspensions were diluted to approximately 2.5×10^3 CFU/ml for groups 1 to 5. All vials of Optisol-GS were refrigerated at 2 to 8°C according to manufacturer

recommendations. After two, seven and fourteen days of incubation, 1 ml of solution was removed, and 10, and 100 μ L aliquots were diluted 1:10 with sterile water to minimize any cycloheximide carryover. Then, the samples were immediately taken from 1ml of solution and cultured in SDA. Then, all plates were incubated at 35°C for 36 h for subsequent counting of viable fungal colonies on the plates. The methodology followed Layer et al ¹⁵ with modifications.

Two-way ANOVA followed by Dunnett's test was performed to assess the effectiveness of cell reduction of *Candida* cells when different concentrations of cycloheximide was added to Optisol and compared to the control. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Safety Study

Five pairs of donor corneas not suitable for transplantation due to positive serology were obtained from Hospital de Clínicas de Porto Alegre Corneal Eye Bank. Two pairs of corneas were used to test cycloheximide at MIC and 3 pairs to test cycloheximide concentration at MICx10. Randomly, by sortation, the selected cornea was placed in cycloheximide supplemented Optisol-GS, and the other cornea from the pair was placed in unsupplemented Optisol-GS as a control. All corneas had endothelial cell density (ECD) evaluated via specular microscopy (Konan KSS-EB10) on day 0 and after 3 and 14 days of cycloheximide supplementation. Paired *t* test was used to compare the mean change in ECD between controls and supplemented Optisol-GS from 0, 3, and 14 days. For statistical analyses, a conservative value of a loss of 500

cells/mm² was used when ECD was indeterminate because of the inability to visualize any clear cell borders, which was assumed to be secondary to severe endothelial damage.

Vital dye staining of the donor corneal endothelium was performed on all corneas at day 14. The stains used were 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich Corp), a vital dye that stains severely damaged and dead endothelial cells, and 0.5% alizarin red (GFS Chemical, Inc), which stains cell borders and denudes Descemet membrane. Staining was conducted based on a protocol published by Park and colleagues ²¹. Each donor cornea was placed in a culture dish with the endothelial facing up. The endothelium was covered with several drops of 0.4% trypan blue for 60 seconds. Trypan blue was then gently poured off, and the cornea was rinsed with phosphate-buffered saline. The cornea was then immersed in 0.5% alizarin red for 90 seconds, followed by rinsing with phosphate-buffered saline. An 8 mm trephine was used to cut the central cornea and then transferred to microscope slides with the endothelium facing up. The endothelium was examined under an Olympus BX51 light microscope (Olympus, Germany) at 200x magnification, attached to an Olympus digital camera. Five photographs of different fields of view within the central and paracentral cornea were taken for each cornea. In each photograph, viable and nonviable cells (stained with trypan blue) were counted in a given area by two blinded examiners, and the mean percentage of nonviable cells (the number of trypan blue cells divided by the total number of cells) was calculated for each cornea and each examiner (Figure 1). The intraclass correlation coefficient was used to assess whether there was a correlation of means between the two examiners. Paired *t* test was used to compare the average of the 2 examiners of percentage of nonviable

cells (the number of trypan blue cells divided by the total number of cells) between controls and supplemented Optisol-GS.

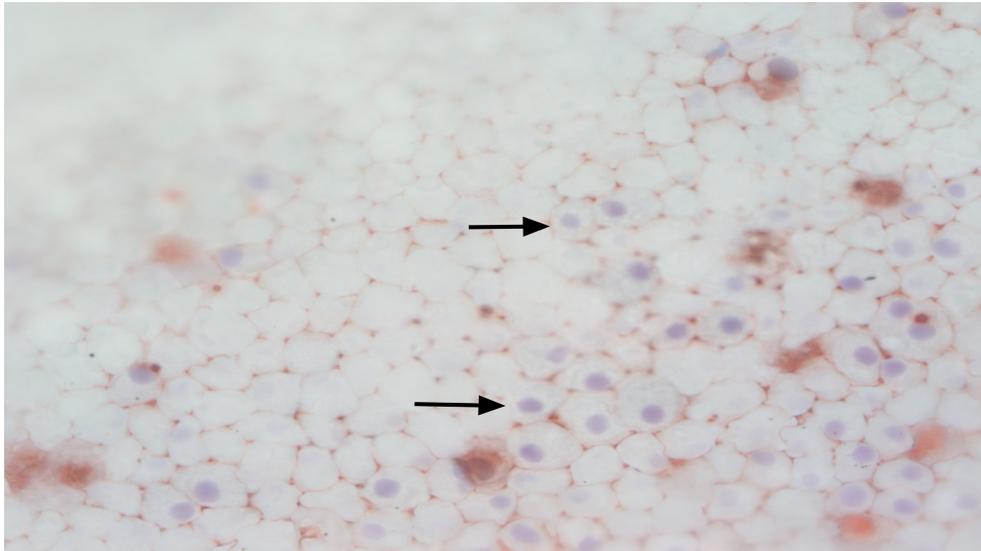


Figure 1. Corneal endothelium stained with 0.4% trypan blue and 0.5% alizarin red (arrows indicate positive trypan blue).

Results

Among the evaluated *Candida* species, CA MS2, CG 05 and ATCC 22019 were sensitive to cycloheximide in the RPMI media and to Optisol-GS supplemented with this antimicrobial at zero time (t=0), demonstrating MIC values between 1.95 - 62.5 µg/ml for

both media. After 14 days (t=14) of incubation in Optisol-GS supplemented with cycloheximide there was an increase in MIC values of this drug against all strains tested (MIC = 3.90 – 125 µg/ml). In addition, after 14 days of incubation, supplementation with cycloheximide in both RPMI and Optisol-GS media was more effective against CG 05 and ATCC 22019 strains (MIC = 3.90 µg/ml) (Table 1).

Table 1. Determination of MIC values (µg/ml) for cycloheximide in RPMI media and in Optisol-GS at time zero (t=0) and after 14 days of incubation (t=14).

Strain	RPMI media	Optisol-GS ^{t=0}	Optisol-GS ^{t=14}
CA MS2 ^a	62.5	62.5	125.0
CG 05 ^b	1.95	1.95	3.90
ATCC 22019 ^c	3.90	1.95	3.90

^a*Candida albicans*, ^b*C. glabrata*, ^c*C. parapsilosis*; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; Concentration of cicloheximide tested in RPMI media and Optisol-GS: 250.0 µg/ml; RPMI media: Roswell Park Memorial Institute 1640 media.

Efficacy study

The three *Candida* spp. strains sensitive to Optisol-GS supplemented with cicloheximide (CA MS2, CG 05, and ATCC 22019) were submitted to the efficacy study. As a result, all strains showed a reduction in fungal cell growth from the second day of incubation in Optisol-GS supplemented with cycloheximide, at all evaluated

concentrations, even at subinhibitory concentrations (MIC/2) (Figure 2). For the CG 05 strain (Figure 2b), there was an expressive reduction in the colony counts from the 2nd day. This reduction became more pronounced until the 14th day, mainly at MICx5 and MICx10 concentrations, in which the colony count was reduced to 99%. For CA MS2 (Figure 2a), there was a reduction in fungal growth after the 2nd day, which remained constant until the 14th day at all concentrations evaluated. ATCC 22019 (Figure 2c) showed an expressive reduction in growth from the 7th day, remaining constant until the 14th day, with a reduction viable cells ranging between 77 and 92 %.

For all strains there was a significant reduction in the number of viable cells at all cyclohexamide concentrations evaluated when compared to the untreated control ($P < 0.05$), demonstrating the anti-*Candida* efficacy of this drug.

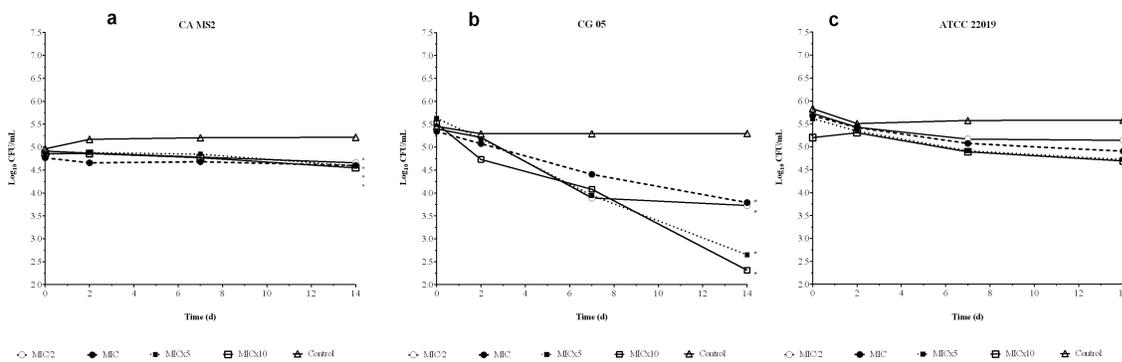


Figure 2: Time-kill plot or colony forming unit concentration (CFU/ml) over time (0, 2, 7, and 14 days) of: a) *C. albicans* (CA MS2), b) *C. glabrata* (CG 05) and c) *C. parapsilosis* (ATCC 22019) in Optisol-GS supplemented with cycloheximide at MIC/2, MIC, MICx5

and MICx10. The asterisks (*) indicate statistical difference when compared to the untreated control (*P < 0.05).

Safety Study

There was a reduction in ECD from day 0 to day 3 of supplementation and day 14 at both concentrations (MIC and MICx10) but appeared to be no difference in ECD reduction between paired controls and antifungal-supplemented Optisol-GS, as shown in Table 2.

The percentage of nonviable endothelial cells as determined by vital dye staining was similar between their paired controls and antifungal supplemented Optisol-GS at both concentrations (Table 2).

Table 2. Changes in Safety Study Variables

Study Variables	Cycloheximide Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	
	MIC (µg/ml)	MICx10 (µg/ml)
Mean in ECD (SD) day 0, No of cells		
Study cornea	2483 (96)	2150 (1247)
Control	2537 (164)	2816(212)
P value ^a control x supplemented (95% CI)	0.818(-2283-2391)	0.410 (-2109-3443)
Mean in ECD (SD) day 3, No of cells		

Study cornea	896 (560)	1632(1666)
Control	500 (0)	1553(1125)
P value ^a (95% CI)	0.500 (-5427-4635)	0.862 (-1796-1638)
<hr/>		
Mean in ECD (SD) day 14, No of cells		
Study cornea	500 (0)	1176 (739)
Control	500 (0)	1937 (1515)
P value ^a (95% CI)		0.232 (-1172-2695)
<hr/>		
Mean nonviable endothelial cells at 14d, %		
Study cornea	82 (8)	57(22)
Control	64 (42)	34 (16)
P value ^a (95% CI)	0.705 (-475-439)	0.352 (-106-60)
<hr/>		
Mean viable endothelial cells at 14d, %		
Study cornea	18 (8)	42 (22)
Control	36 (42)	66 (16)
P value ^a (95% CI)	0.705 (-439-475)	0.352 (-60-106)

Abbreviation: ECD, endothelial Cell Density; SD, standard deviation ; 95% CI: 95% Confidence Interval of the Difference

^a Calculated using the paired *t* test

Discussion

Post-keratoplasty fungal infections have increased significantly in recent years^{6,12,1,4}. These increase in cases are probably associated with endothelial keratoplasty (EK) and the most common isolates have been *Candida* spp., especially *C. albicans* and *C. glabrata*^{18,1}. The other reason for this increase can be the corneal tissue processing, particularly for EK, which requires removal of the tissue from the storage medium and increasing the tissue temperature. In addition, some surveys associated a greater risk of fungal infection after EK when the tissue was prepared in the eye bank compared with tissue prepared in the operating room^{18,6,7} or with surgeons prepared tissue¹⁰.

Hypothermic media are the most commonly used media in the USA and Latin America. In these media, the prevalence of cases of fungal infection was 8 times greater than that of bacterial infection, and fungal infection was more likely when grafts were prepared from corneas that had been stored in hypothermic media (0.5 %) compared with organ culture (0.02 %) ($p < 0.0001$) as shown by Lau and colleagues⁷. Other papers corroborate lower rates of contamination of the donor rim and postoperative infection when the organ culture media were used^{15,34,35}. These differences are possibly attributed to the absence of antifungals in the hypothermic media.

Ritterband et al. published the first study about the addition of voriconazole (100 µg/ml) to Optisol-GS media. The rate of positive cultures in the Optisol-GS media without the supplementation of voriconazole was 12.3% (66/533), of which 7 (10%) were fungi. *C. glabrata* and *C. albicans* were the most prevalent strains. In the rims with voriconazole addition, the positivity culture rate was 11.1% (59/533), but there was no

fungal growth, this difference was statistically significant ($p = 0.015$). Endothelial toxicity was evaluated with vital dyes of trypan blue 0.3% and red alizarin 0.2%. The percentage of non-viable cells stained with the 2 dyes was 0.17% in the group with the addition of voriconazole and 0.22 % without the addition, which was not significantly different ($p < 0.05$). In the stability test, the effectiveness of voriconazole supplementation in suppressing fungal growth was between 6-7 days¹⁷. Interestingly, our study found a time-kill plot earlier than voriconazole, starting within the second day, especially, in *C. glabrata* and *C. albicans* strains. For *C. tropicalis* these findings occurred slightly later, around the seventh day.

Other authors have evaluated the supplementation of voriconazole and amphotericin B at different concentrations in Optisol-GS¹⁵. The efficacy of both supplementations was evaluated in 20 vials of Optisol-GS and divided into 2 groups, as follows: (1) MIC voriconazole (1 $\mu\text{g/ml}$), (2) MIC x 10 voriconazole (10 $\mu\text{g/ml}$), (3) MIC x 25 voriconazole (25 $\mu\text{g/ml}$), (4) MIC x 50 voriconazole (50 $\mu\text{g/ml}$), (5) MIC x 0.25 amphotericin B (0.0625 $\mu\text{g/ml}$), (6) MIC x 0.5 amphotericin B (0.125 $\mu\text{g/ml}$), (7) MIC amphotericin B (4 $\mu\text{g/ml}$) and (8) MIC x 10 amphotericin B (40 $\mu\text{g/ml}$). Two vials (9 and 10) containing Optisol-GS media inoculated (positive control), and only Optisol-GS media (negative control) were used. The study tested two *Candida* spp. strains (*C. albicans* and *C. glabrata*). Due to the known toxicity of amphotericin B, concentrations below the MIC were chosen. Voriconazole, on the other hand, was chosen over the MIC due to studies that reported the absence of toxicity, including the paper of Ritterband et al⁽¹⁷⁾ which added MICx100 to Optisol-GS. In the group that added *C. albicans* to voriconazole there was a similar growth of colony-forming units in all concentrations of

voriconazole and in the positive control group and in the group that added *C. glabrata* there was a reduction of only 70% of the colony-forming units, with no relation to the dose. In the amphotericin B group, there was no fungal growth of *C. albicans* at any concentration tested. For *C. glabrata*, fungal growth occurred only at the lowest concentrations (MICx0.25 and MICx0.5), but colony-forming units were reduced by 99% and 96%, respectively. Safety was achieved through the evaluation of the endothelium by specular microscopy on days 1, 7, and 14, and through the vital dyes of trypan blue 0.4% and red alizarin 0.5%, according to the endothelial evaluation protocol with vital dyes described by Park et al ²¹. Compared to the control, there was only a significant decrease in fungal cell count from 0 to 7th against amphotericin B MICx10 ($p = 0.04$) and a trend at MIC ($p = 0.07$). On the other hand, in the other concentrations and in the voriconazole group there was no significant difference. The percentage of nonviable cells was also significant only at MICx10 in amphotericin B (78% amphotericin B x 10% control $p = 0.02$). This study corroborates with a study that evaluated the effectiveness of amphotericin B at 0.25 $\mu\text{g/ml}$, which is widely used in European eye banks to supplement the organ culture medium ^{14,16}. On the other hand, this study is contradictory to Ritterband et al. ¹⁷, which demonstrated a decrease in the incidence of positive cultures of corneal rims with supplementation with voriconazole. However, these authors used concentrations two times higher (100 $\mu\text{g/ml}$) that could justify this difference.

In our study, supplementation of Optisol-GS media was performed with cycloheximide, an antimicrobial with a known antifungal action, which is inexpensive and works quickly. In the efficacy study, a reduction in fungal cell growth from the 2nd

day of incubation in Optisol-GS media, in all evaluated concentrations, even in sub-inhibitory concentrations (MIC/2), was observed. For *C. glabrata* (CG 05) there was an expressive reduction of 99% in the colony count, on the 14th day at MICx5 and MICx10 concentrations. This indicates that the cycloheximide has a fungicidal action (defined as >99% reduction in colony count) dependent on the concentration and time of this strain. For *C. albicans* (CA MS2) and *C. parapsilosis* (ATCC 22019), the cycloheximide presents only a fungistatic action over the time elapsed, since a reduction of less than 99% in the colony count was observed. These results demonstrate the excellent antifungal activity of cycloheximide against the main strains involved in fungal infections after corneal transplantation, even at subinhibitory concentrations (MIC/2).

Our findings suggest that the Optisol-GS supplemented with cycloheximide may have a better performance than Optisol-GS supplemented with voriconazole or amphotericin B, particularly for *C. glabrata*. Furthermore, its antifungal effect seems to be present even at lower concentrations, overcoming the voriconazole results^{17,15}, and the absence of toxicity even at higher concentrations, surpassing the amphotericin B findings^{19,15, 16}.

One major limitation of our study is the sample size of our toxicity evaluation and new studies must be carried out to strengthen our findings. However, our results suggest a possible benefit in adding cycloheximide to Optisol-GS media, considering the high morbidity of a fungal infection after corneal transplantation. Another limitation of the study is the non-testing of the different dosages of cycloheximide using yeast inoculated into the corneal tissue rather than yeast alone in storage media to better simulate the realistic scenario. The *Candida* species seems to create a biofilm in mammalian cells, becoming more

resistant to azoles drugs and more virulent, explaining higher positive yeast cultures in the Optisol-GS with the corneoscleral tissue than the Optisol-GS alone

In future perspectives, we suggest studies that assess the synergism of two drugs with antifungal action to decrease the concentration and toxicity of one antifungal alone as already suggested by Kowalski et al ²².

Conclusions

Cycloheximide in Optisol-GS decreased significantly the yeast fungal concentration from the second day of preservation. This antifungal agent also demonstrated fungicide action against *C. glabrata* and fungistatic action against *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The addition of cycloheximide at different concentrations in Optisol-GS did not demonstrate toxicity to the corneal endothelium even at high concentrations. Due to its fast action and low cost, cycloheximide can be considered a possible additive to the hypothermic corneal preservation medium.

References

1. Edelstein SL, DeMatteo J, Stoeger CG, MacSai MS, Wang CH. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on Adverse Reactions Reported from 2007 to 2014. *Cornea*. 2016;35(7):917-926A. doi:10.1097/ICO.0000000000000869
2. Taban M, Behrens A, Newcomb RL, Nobe MY, McDonnell PJ. Incidence of Acute

Endophthalmitis Following Penetrating Keratoplasty. 2015;123(May 2005).

3. Chen JY¹, Jones MN², Srinivasan S³, Neal TJ⁴, Armitage WJ⁵ KSNOTAG and CO (OTAG AS 18). Endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2015;122(1):25-30. doi:doi: 10.1016/j.ophtha.2014.07.038. Epub 2014 Sep 26.
4. Borkar DS, Wibbelsman TD, Buch PM, et al. Endophthalmitis Rates and Clinical Outcomes Following Penetrating and Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2019;205:82-90. doi:10.1016/j.ajo.2019.05.004
5. Hassan SS, Wilhelmus KR. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(4):685-690. doi:10.1016/j.ajo.2004.12.016
6. Aldave AJ, Dematteo J, Glasser DB, et al. Report of the eye bank association of America medical advisory board subcommittee on fungal infection after corneal transplantation. *Cornea*. 2013;32(2):149-154. doi:10.1097/ICO.0b013e31825e83bf
7. Lau N, Hajjar Sesé A, Augustin VA, et al. Fungal infection after endothelial keratoplasty: Association with hypothermic corneal storage. *Br J Ophthalmol*. Published online 2018:1-4. doi:10.1136/bjophthalmol-2018-312709
8. Vislisel JM, Goins KM, Wagoner MD, et al. Incidence and Outcomes of Positive Donor Corneoscleral Rim Fungal Cultures after Keratoplasty. *Ophthalmology*. 2017;124(1):36-42. doi:10.1016/j.ophtha.2016.09.017

9. Wilhelmus KR, Hassan SS. The Prognostic Role of Donor Corneoscleral Rim Cultures in Corneal Transplantation. *Ophthalmology*. 2007;114(3):440-445. doi:10.1016/j.ophtha.2006.09.006
10. Mian SI, Aldave AJ, Tu EY, et al. Incidence and Outcomes of Positive Donor Rim Cultures and Infections in the Cornea Preservation Time Study. *Cornea*. 2018;37(9):1102-1109. doi:10.1097/ICO.0000000000001654
11. Borowsky CM, Wallau AD, Reetz A, Kwitko S, Rymer S, Locatelli CI. Contaminação de halos doadores córneo-esclerais em ceratoplastia penetrante no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(1):13-17. doi:10.1590/s0004-27492008000100003
12. Mathes KJ, Tran KD, Mayko ZM, Stoeger CG, Straiko MD, Terry MA. Reports of Post-keratoplasty Infections for Eye Bank-prepared and Non–Eye Bank-prepared Corneas. *Cornea*. 2019;38(3):263-267. doi:10.1097/ico.0000000000001839
13. Li S, Zhong J, Tan Y, et al. Microbiological Screening of Hypothermic Preserved Donor Corneas in Keratoplasty. *Curr Eye Res*. 2019;0(0):1-8. doi:10.1080/02713683.2019.1616766
14. Ling MLH, Wells M, Petsoglou C, et al. Factors Affecting Corneal Organ Culture Contamination: A 6-year Study at the New South Wales Tissue Bank. *Cornea*. 2019;38(7):829-835. doi:10.1097/ICO.0000000000001936
15. Layer N, Cevallos V, Maxwell AJ, Hoover C, Keenan JD, Jeng BH. Efficacy and safety of antifungal additives in Optisol-GS corneal storage medium. *JAMA*

- Ophthalmol.* 2014;132(7):832-837. doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.397
16. Tran D, Dhaliwal D, Kamyar R, Jhanji V. Effect of Optisol Supplementation With 0.255 mg / mL. 2019;38(7):901-904.
 17. Ritterband DC, Shah MK, Meskin SW, et al. Efficacy and safety of voriconazole as an additive in Optisol GS: A preservation medium for corneal donor tissue. *Cornea.* 2007;26(3):343-347. doi:10.1097/ICO.0b013e31802d82e8
 18. Brothers KM, Shanks RMQ, Hurlbert S, Kowalski RP, Tu EY. Association between fungal contamination and eye bank-prepared endothelial keratoplasty tissue - Temperature-dependent risk factors and antifungal supplementation of optisol-gentamicin and streptomycin. *JAMA Ophthalmol.* 2017;135(11):1184-1190. doi:10.1001/jamaophthalmol.2017.3797
 19. Duncan K, Parker J, Hoover C, Jeng BH. The effect of light exposure on the efficacy and safety of amphotericin B in corneal storage media. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(4):432-436. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0008
 20. Li J, Feiz V, Vieira AC, Davis-Boozer D, Polage C. The safety and efficacy of linezolid and daptomycin as an additive in optisol-GS against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cornea.* 2012;31(5):551-558. doi:10.1097/ICO.0b013e318226c6b3
 21. Park S, Fong AG, Cho H, et al. Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. *Cornea.* 2012;31(12):1476-1479. doi:10.1097/ICO.0b013e31824d0dda

22. Kowalski RP, Raj CVS, Stuart JC, Dunn DS. Antifungal Synergism: A Proposed Dosage for Corneal Storage Medium. *Arch Ophthalmol*. 1985;103(2):250-256.
doi:10.1001/archopht.1985.01050020102030
23. Kominek LA. Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: control mechanisms of cycloheximide biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1975;7(6):856-860. doi:10.1128/AAC.7.6.856
24. Salkin IF, Hurd N. Quantitative evaluation of the antifungal properties of cycloheximide. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972;1(3):177-184.
doi:10.1128/AAC.1.3.177
25. DEHOUX P, DAVIES J, CANNON M. Natural cycloheximide resistance in yeast: The role of ribosomal protein L41. *Eur J Biochem*. 1993;213(2):841-848.
doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17827.x
26. Venkatesh Prajna N, Krishnan T, Mascarenhas J, et al. The mycotic ulcer treatment trial: A randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131(4):422-429. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.1497
27. Venkatesh Prajna N, Krishnan T, Rajaraman R, et al. Effect of Oral Voriconazole on Fungal Keratitis in the Mycotic Ulcer Treatment Trial II (MUTT II): A Randomized Clinical Trial Committees-Data and Safety Monitoring Committee: HHS Public Access Author manuscript. 2016;134(12):1365-1372.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.4096
28. Florcruz N, Evans, J. R. Medical interventions for fungal keratitis (Review)

SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(4):1469-1493.

doi:10.1002/14651858.CD004241.pub4.www.cochranelibrary.com

29. Venkatesh Prajna N, Lalitha P, Rajaraman R, et al. Changing azole resistance: A secondary analysis of the MUTT I randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(6):693-696. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0530
30. Bae JH, Sung BH, Sohn JH. Site saturation mutagenesis of ribosomal protein L42 at 56th residue and application as a consecutive selection marker for cycloheximide resistance in yeast. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(8):1-6. doi:10.1093/femsle/fny066
31. De Souza CC, Pellizzon CH, Hiraishi M, Goldman MHS, Goldman GH. Isolation and characterisation of cycloheximide-sensitive mutants of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* 1998;33(1):60-69. doi:10.1007/s002940050309
32. Clinical and Laboratory Standards Institute C. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement - M27-S3. *Clin Lab Standars Inst - NCCLS.* Published online 2008.
33. CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-; CLSI Document M27-A3.*; 2008.
34. Fontana L, Errani PG, Zerbinati A, Musacchi Y, Pede B Di, Tassinari G. Frequency of positive donor rim cultures after penetrating keratoplasty using

hypothermic and organ-cultured donor corneas. *Cornea*. 2007;26(5):552-556.

doi:10.1097/ICO.0b013e3180415d7e

35. Elisabeth P, Hilde B, Ilse C. Eye bank issues: II. Preservation techniques: Warm versus cold storage. *Int Ophthalmol*. 2008;28(3):155-163. doi:10.1007/s10792-007-9086-1

ACKNOWLEDGMENT SECTION

The authors thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – EDITAL 04/2016 – PRONUPEQ 2016) for financial support and research fellowships. This study was financed in part by the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) – Finance Code 001, and was approved by science ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

We would like to inform that the manuscript is submitted on behalf of all authors and that it is an original research not previously published and that it is not being considered for publication elsewhere.

All authors declare to have no conflict of interest.

Author Contributions

All authors made a significant contribution to the work reported, whether that is in the conception, study design, execution, acquisition of data, analysis and interpretation, or in all these areas; took part in drafting, revising or critically reviewing the article; gave final approval of the version to be published; have agreed on the journal to which the article has been submitted; and agree to be accountable for all aspects of the work.