

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROSPECÇÃO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS PARA O COMBATE DE
FUNGOS DE IMPORTÂNCIA NA CLÍNICA MÉDICA OFTALMOLÓGICA

PAULA REGINATTO

Porto Alegre

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PROSPECÇÃO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS PARA O COMBATE DE
FUNGOS DE IMPORTÂNCIA NA CLÍNICA MÉDICA OFTALMOLÓGICA**

Tese apresentada por **Paula Reginatto**
para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR(A) em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Porto Alegre

2023

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.09.2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Augusto Schrank

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Carneiro

Universidade de Santa Cruz do Sul

Prof. Dr. Walter Orlando Beys

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Reginatto, Paula
PROSPECÇÃO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS PARA O COMBATE
DE FUNGOS DE IMPORTÂNCIA NA CLÍNICA MÉDICA
OFTALMOLÓGICA / Paula Reginatto. -- 2023.
333 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. Infecções fúngicas oculares. 2. Córneas. 3.
8-hidroxiquinolinas. 4. Fármacos antifúngicos. 5.
Biofilme. I. Meneghello Fuentefria, Alexandre, orient.
II. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria, localizado no Anexo II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); no Laboratório de Síntese Farmacêutica (PHARSG) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em parceria com o Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade; no Centro de Biotecnologia da UFRGS, em parceria com a Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein; no Banco de Tecidos e Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em parceria com a Prof^a. Dra. Diane Ruschel Marinho; no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia do Instituto Federal de Catarinense, em colaboração com o Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira. Financiamento da CAPES e FAPERGS (04/2016, 16/2551-0000517-6).

Bolsa de estudos financiada pela CAPES.

DEDICATÓRIA

À minha maior incentivadora, minha mãe Cleuza Delazeri (*in memoriam*), meu exemplo de força, generosidade e amor.

À minha família: meu pai Ademir Reginatto e meus avós, Hugo Delazeri (*in memoriam*), Ângela Mânica Delazeri, Francisco Reginatto (*in memoriam*) e Gema Bonfanti Reginatto.

AGRADECIMENTOS

Foram quatro anos e meio de muito trabalho, inúmeras horas e finais de semana no laboratório, tantos anos de esforço e dedicação que resultaram nesta tese. Mas nada disso seria possível se ao longo deste caminho eu não tivesse encontrado tantas pessoas especiais. Foram oito anos dentro do grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (LPMA) e nesta caminhada eu tive o privilégio de encontrar muitas pessoas maravilhosas, algumas numa breve passagem e outras que levarei para a vida. Isso torna a escrita dos agradecimentos uma tarefa muito difícil, as palavras jamais conseguiram expressar toda a minha gratidão.

Eu começo agradecendo a Deus por me permitir chegar até aqui!

Agradeço ao meu orientador, professor Alexandre Fuentefria, que abriu as portas do laboratório para mim lá em 2015. Minha sincera admiração ao profissional e ser humano que és e minha imensa gratidão pela oportunidade. Obrigada pelos conselhos, pelo conhecimento transmitido e, acima de tudo, por estar sempre com as portas abertas para uma conversa ou um desabafo. Obrigada por nos acolher, por ser este orientador tão extraordinário, humano e compreensivo. Obrigada pela confiança que em mim depositaste e pela generosidade em me auxiliar no meu crescimento profissional. Tens meu respeito, minha gratidão e minha admiração! OBRIGADA!

Agradeço ao professor Dr. Saulo Fernandes de Andrade, ser humano e profissional que eu admiro tanto. Agradeço por ter cruzado o meu caminho, pela confiança e oportunidade, por ter me estendido a mão lá na graduação e me conduzido à pesquisa. Aquele “jeitinho mineiro” educado e gentil, extremamente dedicado e muito competente. Ao grupo do Laboratório de Síntese Farmacêutica, pessoas incríveis que lá encontrei, mas meu agradecimento vai principalmente à Angélica, hoje professora Dra. Angélica Joaquim. Minha gratidão pela ajuda, disponibilidade em tantas ocasiões, pela gentileza e pela incrível parceria de trabalho, sempre atenciosa e dedicada, nunca mediu esforços para me auxiliar. Obrigada por dividir tua molécula e jornada de doutorado comigo! Levarei nossa amizade para a vida.

Agradeço as grandiosas parcerias de trabalho. Ao professor Dr. Mário Littieri Teixeira por suas contribuições e explicações. À professora Dra. Marilene Henning Vanstein por ter aberto as portas do seu laboratório e ter me recebido tão bem. Estendo

meu agradecimento à sua aluna de iniciação científica, Maria Eduarda Krummenauer, pela dedicação, tempo e auxílio na execução de experimentos. À professora Dra. Diane Ruschel Marinho por abrir as portas do Serviço de Oftalmologia, ceder as amostras biológicas e disponibilizar o espaço e profissionais para auxílio na execução dos experimentos. Da mesma forma, estendo meu agradecimento aos profissionais que ali encontrei: Claudete Locatelli, Eduarda Freitas e Karina Bambini, sempre tão solícitas, gentis e dispostas a ajudar. Minha gratidão a todos por suas contribuições!

Aos membros da banca, professor Dr. Walter Beys, professor Dr. Augusto Schrank, professora Dra. Diane Marinho, professor Dr. Régis Zanette e professor Dr. Marcelo Carneiro, meu sincero agradecimento pelas contribuições, disponibilidade e tempo despendido. Meu carinho e admiração! Ainda, gostaria de agradecer aos órgãos de fomentos, especialmente a CAPES, pelo apoio financeiro fornecido através da bolsa de estudo. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e a todos os professores e colegas ao longo deste trabalho, muito obrigada pela essencial ajuda, por todo aprendizado e convívio. À secretária do PPGCF, Valência, sempre tão solícita. Ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS.

Agradeço ao grupo do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, pelos momentos de intenso trabalho, colaboração e descontração. Um agradecimento muito, muito especial à minha “filha científica”, Giovanna de Jesus Agostinetti, pelos dois anos de muito trabalho, conselhos, desabafos, fofocas e mútuo aprendizado, sem dúvida uma amiga do laboratório para além dele. Ao pessoal do CEPNAT, que me adotou nos últimos meses, ali no final do caminho ganhei mais uma “família científica”, que sempre me recebeu muito bem. Em especial ao trio colorado: Juliana Butzge, Letícia Mezzomo e Mariana Fiório, meus sóis em dias nublados. Amigas que levarei pra vida.

E aqueles presentes que o LPMA me deu ao longo desta jornada e eu levo para a vida, “no lado esquerdo do peito”. Minhas amigas amadas, que eu sinto saudade todos os dias, as quais tornaram esta caminhada mais leve, divertida e amorosa. Minha “mãe científica”, que era minha chefe, virou colega e depois amiga, quem me incentivou a fazer mestrado: Bruna Pippi. Foram tantos momentos incríveis, tantos aprendizados, trabalho árduo, horas de laboratório, papos, desabafos, piqueniques em

dias de experimentos eternos, risadas, enfim, foram momentos inesquecíveis. À Vanessa Bergamo, que eu não tenho palavras, és luz na minha vida! Agradeço por ter te encontrado nesta caminhada, oito anos atrás, e poder ter o privilégio de levá-la para a vida. Tu foste essencial neste trajeto! Exemplo de força e determinação! À Gabriella da Rosa Monte Machado, que eu não tenho palavras para agradecer por tanta troca que tivemos neste processo, trocas profissionais, de amizade, de vida. Quem tem uma Gabi, tem tudo! A distância nos aproximou ainda mais. À Priscilla Quattrin pelo apoio, amizade e parceria, profissional excelente e um ser humano sem explicação. Magda de Chaves, Bárbara da Costa, Letícia Fernandes eu vivi momentos maravilhosos com vocês, criamos um laço de amizade que nem mesmo o tempo ou distância consegue apagar. Saudade dos chimas e das “cantorias”, das surpresas de aniversários. A amiga das amigas também virou amiga, obrigada por fazer parte desta jornada Simone Merkel!

Meu agradecimento de coração àquelas amigas que seguraram na minha mão lá na graduação e nunca mais soltaram: Mairique Waszczuk, Mariana Dias e Sarah Campanharo. Obrigada pela amizade e incentivo de sempre! Aos meus eternos companheiros de apartamento: Jéssica de Moura e Eduardo Delazeri. À minha melhor amiga da vida: Luiza Polesi.

Agradeço imensamente à minha família, que é a minha base e minha força motriz. Meus tios, primos e meus avós. Sabe aquela história de que família não é só laço sanguíneo? Pois então, a minha é a prova irrefutável disso. Obrigado por ser suporte quando a vida me tirou o chão! Obrigada aos meus sogros, Maria e Amélio, que são meus segundos pais e à minha cunhada, Raquel, que foi uma ‘mão amiga’ em um momento muito difícil da vida.

Agradeço ao meu pai, Ademir, por sempre ter uma palavra de incentivo, um conselho ou simplesmente um abraço. Obrigada por abdicar de tanto na tua vida para que eu pudesse vislumbrar esta oportunidade no futuro! Foi meu escudo e apoio em meio à guerra impiedosa da vida. Fomos companheiros de batalha numa guerra muito cruel, que tirou nosso chão, nosso norte. Obrigada por tudo!

Minha eterna gratidão ao meu parceiro de vida, Rafael Gonzatti. Abdiquei de muito para chegar até aqui: feriados, finais de semana, férias, aniversários, datas

comemorativas, festas de família... E ele sempre me apoiando, me incentivando. Obrigada por compreender as minhas ausências, a minha falta de tempo, o meu cansaço... Obrigada pela paciência, conselhos, ajuda, apoio!

Meu agradecimento mais profundo vai para a minha mãe, Cleuza (*in memoriam*), a maior incentivadora dos meus sonhos. A pessoa mais importante da minha vida e que abdicou da vida dela para que eu pudesse viver e sonhar a minha. Minha gratidão eterna por ter sido o maior exemplo de generosidade, humildade e bondade que alguém poderia ter na vida. Guerreira, determinada e muito alegre, foi a imagem que deixou, foi assim que marcou a vida de todos. A vida não permitiu que estivesse fisicamente aqui para ver este momento que tanto sonhamos. Este sonho é NOSSO! Te amo muito!

Encerro este ciclo com o coração transbordando gratidão por cada gesto, cada ajuda, cada palavra e com a certeza de que sou muito privilegiada por ter tantas pessoas especiais na minha vida.

“Há uma força motriz mais poderosa do
que o vapor, a eletricidade e a energia
atômica: a vontade.”

Albert Einstein

RESUMO

PROSPECÇÃO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS PARA O COMBATE DE FUNGOS DE IMPORTÂNCIA NA CLÍNICA MÉDICA OFTALMOLÓGICA

Anualmente, as infecções fúngicas oculares podem afetar até 2.000.000 de pessoas em todo mundo, com crescimento significativo nas últimas décadas. Estas infecções oculares são normalmente graves e de rápida progressão. Podem acometer todas as estruturas do globo ocular, principalmente a córnea (ceratite), mas também pode atingir tecidos internos e envolver a estrutura ocular como um todo (endoftalmite). Uma vez que o diagnóstico normalmente é tardio, o desfecho é grave na maioria dos casos, com cegueira e/ou necessidade de remoção do globo ocular. A fonte dessas infecções pode ser pela disseminação hematogênica, predominantemente leveduras, principalmente do gênero *Candida*. A origem também pode ser externa, traumas e/ou cirurgias, com predominância dos fungos filamentosos, como o gênero *Fusarium*. Podem ocorrer como complicações infecciosas pós-transplantes de córneas, com origem, normalmente, proveniente do tecido doador, uma vez que os meios de preservação de córneas atuais contêm antimicrobianos com espectro apenas antibacteriano. Isto também reflete como um problema no suprimento de tecido em relação à fila de espera, bem como um impacto financeiro devido ao custo envolvido no processo de captação e armazenamento do tecido. O tratamento dessas infecções acaba sendo definido de maneira empírica, ocorrendo muitas falhas e uma intensa dinâmica no esquema terapêutico e manejos clínicos no decorrer do processo da terapia. Associado a isto, temos a questão da escassa disponibilidade de opções terapêuticas e suas inúmeras limitações, principalmente relacionadas às características da molécula frente ao tecido afetado. O tratamento atual é baseado, principalmente, no uso de polienos (natamicina – NAT e anfotericina B - AMB) e azóis (como o voriconazol - VRC). Devido a este limitado arsenal terapêutico disponível, novos compostos derivados de 8-hidroxiquinolina (clioquinol – CLQ e PH151), uma classe com perfil antifúngico promissor, foram avaliados frente aos patógenos fúngicos mais relevantes em infecções oculares. Os agentes fúngicos, novos (CLQ e PH151) e comerciais (VRC, NAT e AMB), foram testados sozinhos e em diferentes combinações duplas, triplas e

quádrupla. O composto PH151 e, principalmente, CLQ apresentaram excelentes perfis antifúngicos, tanto em uso isolado como em algumas das associações, com perfil de atividade comparável e até mesmo superior aos agentes antifúngicos comerciais. Embora efeitos sinérgicos das combinações não sejam absolutos, não apresentam interação antagônica, permitindo a politerapia ou o uso concomitante destes agentes antifúngicos, o que é muito comum nas infecções oculares. Além disso, o perfil promissor dos compostos e combinações também permite que sejam investigados como princípios ativos em meios de preservação de córneas, como estratégia preventiva. Os agentes antifúngicos e combinações são promissores candidatos à terapia antifúngica curativa e preventiva, uma vez que o perfil toxicológico tópico demonstrou baixa toxicidade ocular, em testes *in vitro* e *in silico*. Ainda, a combinação mais promissora (VRC-AMB-CLQ) apresentou alta capacidade de impedir a adesão fúngica ao tecido da córnea, inibir a formação de biofilme sobre este tecido e ao longo de 14 dias foi capaz de reduzir significativamente o inóculo fúngico presente no meio, com ação fúngida. No entanto, em termos de segurança de uso e avanços para testes *in vivo*, maiores esclarecimentos acerca de seu perfil toxicológico sobre os tecidos oculares precisam ser apurados.

Palavras-chave: infecção fúngica ocular; antifúngico; epidemiologia fúngica; ceratite; endoftalmite; córnea; meios de preservação.

ABSTRACT

PROSPECTION OF ANTIFUNGAL AGENTS TO COMBAT IMPORTANT FUNGI IN OPHTHALMOLOGICAL MEDICAL CLINICS

Annually, ocular fungal infections can affect up to 2,000,000 people worldwide, with significant growth in recent decades. These eye infections are usually serious and rapidly progressing. They can affect all structures of the eyeball, mainly the cornea (keratitis), but can also affect internal tissues and involve the ocular structure as a whole (endophthalmitis). Since the diagnosis is usually late, the outcome is serious in most cases, with blindness and/or the need to remove the eyeball. The source of these infections may be hematogenous dissemination, predominantly yeasts, mainly of the *Candida* genus. The origin can also be external, trauma and/or surgery, with a predominance of filamentous fungi, such as the genus *Fusarium*. They can occur as infectious complications after corneal transplants, normally originating from the donor tissue, since current corneal preservation methods contain antimicrobials with an antibacterial spectrum only. This also reflects a problem in tissue supply in relation to the waiting list, as well as a financial impact due to the cost involved in the tissue capture and storage process. The treatment of these infections ends up being defined empirically, with many failures and intense dynamics occurring in the therapeutic scheme and clinical management throughout the therapy process. Associated with this, we have the issue of the scarce availability of therapeutic options and their numerous limitations, mainly related to the characteristics of the molecule in relation to the affected tissue. Current treatment is mainly based on the use of polyenes (natamycin – NAT and amphotericin B – AMB) and azoles (such as voriconazole – VRC). Due to this limited therapeutic arsenal available, new compounds derived from 8-hydroxyquinoline (clioquinol – CLQ and PH151), a class with a promising antifungal profile, were evaluated against the most relevant fungal pathogens in ocular infections. Fungal agents, new (CLQ and PH151) and commercial (VRC, NAT and AMB), were tested alone and in different double, triple and quadruple combinations. The compound PH151 and, mainly, CLQ presented excellent antifungal profiles, both in isolation and in some combinations, with an activity profile comparable to and even superior to commercial antifungal agents. Although the synergistic effects of the combinations are

not absolute, they do not present antagonistic interactions, allowing polytherapy or the concomitant use of these antifungal agents, which is very common in ocular infections. Furthermore, the promising profile of the compounds and combinations also allows them to be investigated as active ingredients in corneal preservation media, as a preventive strategy. Antifungal agents and combinations are promising candidates for curative and preventive antifungal therapy, since the topical toxicological profile demonstrated low ocular toxicity *in vitro* and *in silico* tests. Furthermore, the most promising combination (VRC-AMB-CLQ) showed a high capacity to prevent fungal adhesion to the corneal tissue, inhibit the formation of biofilm on this tissue and over 14 days was able to significantly reduce the fungal inoculum present in the cornea medium, with fungicidal action. However, in terms of safety of use and advances *in vivo* testing, further clarification regarding its toxicological profile on ocular tissues needs to be determined.

Keywords: fungal eye infection; antifungal; fungal epidemiology; keratitis; endophthalmitis; cornea; means of preservation

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** APRESENTA ALGUMAS DAS ESTRUTURAS DO GLOBO OCULAR, COM DESTAQUE PARA AS CAMADAS QUE COMPÕE O TECIDO CORNEANO..... 45
- FIGURA 2.** AS TRÊS PRINCIPAIS FORMAS CLÍNICAS DE INFECÇÕES FÚNGICAS OCULARES:
A) CERATITE; B) ENDOFTALMITE ENDÓGENA; C) ENDOFTALMITE EXÓGENA..... 45
- FIGURA 3.** INFECÇÃO OCULAR POR *FUSARIUM SOLANI*: A) APRESENTAÇÃO CLÍNICA DE ENDOFTALMITE; B) MACROMORFOLOGIA DA COLÔNIA; C) MICROMORFOLOGIA: HIFAS E CONÍDIOS. 57
- FIGURA 4.** INFECÇÃO OCULAR POR *ASPERGILLUS SPP.*: A) APRESENTAÇÃO CLÍNICA DE ENDOFTALMITE EXÓGENA; B) MACROMORFOLOGIA DA COLÔNIA; C) MICROMORFOLOGIA: CONIDIÓFOROS E CONÍDIOS. 58
- FIGURA 5.** INFECÇÃO OCULAR POR *CANDIDA ALBICANS*: A) CERATITE; B) MACROMORFOLOGIA DA COLÔNIA EM CHROMAGAR CANDIDA, APRESENTANDO COLÔNIAS EM UM TOM ESVERDEADO; C) MICROMORFOLOGIA: CLAMIDÓSPOROS E BASTOCONÍDIOS. 60
- FIGURA 6.** INFECÇÃO OCULAR POR *CURVULARIA SPP.*: A) APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA CERATITE; B) MACROMORFOLOGIA; C) MICROMORFOLOGIA: CONÍDIOS..... 61
- FIGURA 7.** PRINCIPAIS FÁRMACOS UTILIZADOS EM INFECÇÕES FÚNGICAS OCULARES E SEUS RESPECTIVOS PESOS E ESTRUTURAS MOLECULARES..... 88
- FIGURA 8.** REPRESENTADAS AS ETAPAS DE FORMAÇÃO DE UM BIOFILME POR LEVEDURAS. FASE INICIAL OU DE ADERÊNCIA (A): ADESÃO DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS A UMA SUPERFÍCIE; FASE INTERMEDIÁRIA OU PROLIFERAÇÃO (B): PROLIFERAÇÃO CELULAR E FORMAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR; FASE FINAL OU MATURAÇÃO (C): BIOFILME FORMADO MADURO, COM ESPESSEAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR, MAIOR DIFERENCIAÇÃO CELULAR E SISTEMA QUÓRUM-SENSING DESENVOLVIDO; FASE DE DISPERSÃO (D): BIOFILME EM FASE DE DISPERSÃO, LIBERANDO CÉLULAS QUE PODERÃO ADERIR-SE A OUTRAS SUPERFÍCIES E FORMAR NOVOS BIOFILMES, DANDO CONTINUIDADE AO CICLO. 93

FIGURA 9. BIOFILMES FÚNGICOS EM LENTE DE CONTATO: A) <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> ; B) <i>FUSARIUM SOLANI</i> ; C) <i>ASPERGILLUS TERREUS</i>	95
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA: A) NÚCLEO QUINOLÍNICO; B) 8-HIDROXIQUINOLINA.	100
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS DE 8- HIDROXIQUINOLINA: A) CLIOQUINOL E B) PH151.	103
FIGURA 12. HALOS CÓRNEO-ESCLERAIS EM MEIO DE PRESERVAÇÃO APRESENTANDO CRESCIMENTO FÚNGICO.	115

LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS

8-HQ: 8-hidroxiquinolina

ABTO: Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

AMB: anfotericina B

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosine Triphosphate

CAM-TBS: Chorioallantoic Membrane Test with Trypan Blue Staining

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLQ: clioquinol

Covid-19: Coronavirus disease 2019

Da: Daltons

DNA: Deoxyribonucleic Acid

EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid

FDA: Food and Drug Administration

GAFFI: Global Action Fund for Fungal Infections

HET-CAM: Chorioallantoic Membrane Chicken Egg Test

HIV: Human Immunodeficiency Virus

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial

NaOH: Hidróxido de Sódio

NAT: natamicina

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: Polymerase Chain Reaction

PH151: 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil)sulfonamida

SARS-Cov-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

SMON: subacute myelo-optic neuropathy

TPK: therapeutic penetrating keratoplasty

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

VRC: voriconazol

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a tese segue a seguinte organização:

- 1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA**
- 2. OBJETIVOS**
- 3. MAPA CONCEITUAL DO TRABALHO**
- 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**
- 5. MANUSCRITOS – CAPÍTULOS I, II, III, IV E V**
- 6. DISCUSSÃO GERAL**
- 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**
- 8. REFERÊNCIAS**

Os tópicos 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8 foram formatados conforme padrões técnicos estabelecidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), através das NBR 6023/2002; NBR 10520/2002 e NBR 14724/2011. Os capítulos contidos no tópico 5 são artigos que foram formatados conforme as normas das revistas selecionadas para posterior submissão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	27
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GERAL	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. REFERENCIAL TEÓRICO	41
4.1. INFECÇÕES FÚNGICAS.....	41
4.1.1. INFECÇÕES FÚNGICAS OCULARES	42
4.1.1.1. ANATOMIA OCULAR.....	43
4.1.1.2. FORMAS CLÍNICAS: CARACTERÍSTICAS.....	45
4.1.1.3. TIPOS DE INFECÇÕES: PORTAS DE ENTRADA E AGENTES ETIOLÓGICOS.....	48
4.1.1.3.1.CERATITE	51
4.1.1.3.2.ENDOFTALMITE EXÓGENA	54
4.1.1.3.3.ENDOFTALMITE ENDÓGENA	55
4.1.1.3.4.AGENTES ETIOLÓGICOS: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS	56
4.1.1.3.5.DIAGNÓSTICO	64
4.1.1.3.6.TERAPIA: FARMACOLÓGICA E NÃO FARMACOLÓGICA.....	65
4.1.1.3.7.RESISTÊNCIA	89
4.1.1.3.8.BIOFILMES FÚNGICOS	91
4.1.1.4. NOVAS ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO.....	97
4.1.1.4.1 NOVOS COMPOSTOS.....	98
4.1.1.4.2 ASSOCIAÇÕES	104
4.1.1.5. NOVAS ESTRATÉGIAS PREVENTIVAS DE INFECÇÃO	106
4.1.1.5.1 TRANSPLANTE DE CÓRNEA E MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO.....	107
4.1.2. COVID-19 E TRANSPLANTES DE CÓRNEA.....	115
5. MANUSCRITOS.....	117
CAPÍTULO I.....	119
8-hydroxyquinoline and quinazoline derivatives as potential new alternatives to combat <i>Candida</i> spp. biofilm.....	119

CAPÍTULO II	141
EYE FUNGAL INFECTIONS: A MINI REVIEW	141
CAPÍTULO III	199
Antifungal potential of clioquinol and its combinations against fungi of interest in eye infections.....	199
CAPÍTULO IV	225
8-hydroxyquinoline derivative as a promising antifungal agent to combat fungal eye infections.....	225
CAPÍTULO V	255
Potential new antifungal active in human corneal preservation media.....	255
6. DISCUSSÃO GERAL	281
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	281
8. REFERÊNCIAS	301
9. ANEXOS	326

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

As infecções fúngicas vêm aumentando à medida que os fatores de risco a elas associados também vêm crescendo (Pappas *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2018; Mehrandish e Mirzaeei, 2021; Musuuza *et al.*, 2021; Spallone e Schwartz, 2021). As infecções fúngicas oculares representam importante patologia fúngica, de rápida progressão e comprometimento tecidual, podendo, inclusive, representar uma porta de entrada para uma infecção sistêmica (Słowik *et al.*, 2015). Estas infecções podem afetar até dois milhões de pessoas anualmente em todo mundo e representam importante causa de morbidade e cegueira (Thomas, 2003a; Kalkanci e Ozdek, 2010; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). O diagnóstico frequentemente é tardio e o desfecho é grave na maioria dos casos, com perda total da visão em até 60% dos casos e/ou necessidade de remoção do globo ocular conforme a GAFFI. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), infecções da córnea são uma das principais causas de perda de visão, perdendo apenas para a catarata em importância geral (Srinivasan, 2004; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). A ceratite fúngica é uma doença devastadora e representa a segunda causa mais comum de cegueira em países em desenvolvimento (Kaur e Kakkar, 2010).

O globo ocular é uma estrutura complexa e as infecções fúngicas podem afetar inúmeras de suas estruturas (Helene e Helene, 2011). Infecções fúngicas oculares podem envolver a córnea (ceratite), que é a apresentação mais frequente, mas a órbita, pálpebras, aparelho lacrimal, conjuntiva, esclera e estruturas intraoculares (interior do olho – endoftalmite) também podem ser atingidos (Thomas, 2003a; Kaur e Kakkar, 2010; Słowik *et al.*, 2015). A ceratite fúngica representa um desafio para o oftalmologista devido sua tendência a mimetizar outros tipos de inflamação do estroma (Thomas, 2003b). A infecção por fungo na córnea pode levar a endoftalmite à medida que o fungo cresce e dissemina através da córnea e no humor aquoso (Durand, 2013). O termo "endoftalmite" refere-se à infecção do vítreo e/ou aquoso por bactérias ou fungos. Dessa forma, endoftalmite pode ser uma das infecções oculares mais devastadoras, ocasionando danos graves e irreversíveis (Durand, 2017). Em populações mais

vulneráveis, como imunocomprometidos, a endoftalmite pode disseminar (Debourgogne *et al.*, 2016; Kauffman, 2016; Relhan *et al.*, 2018).

Os fungos são oportunistas no olho, raramente infectam tecidos oculares que estejam saudáveis e íntegros, necessitam de uma lesão penetrante ou um defeito epitelial anterior, estabelecendo, assim, uma porta de entrada. No entanto, após sua entrada, são capazes de se estabelecer e proliferar rapidamente (Thomas, 2003a; Kaur e Kakkar, 2010). A maioria das infecções fúngicas oculares envolvem alta morbidade, que está importantemente associada a fatores, como o dano físico ocasionado pela própria presença do patógeno fúngico, a resposta gerada pelo hospedeiro e a resposta inflamatória leucocítica infiltrativa, substâncias fúngicas produzidas e o dano secundário de toxinas e enzimas fúngicas (Kaur e Kakkar, 2010). A patogênese das infecções oculares também é ligada à epidemiologia da doença (Kalkanci e Ozdek, 2010).

A incidência de infecções oculares aumentou importantemente no mundo, principalmente ceratite. Os fungos são responsáveis por 1-45% das ceratites infecciosas, mas variações ocorrem de acordo com a localização geográfica (Mills *et al.*, 2020). A incidência/prevalência de infecções fúngicas oculares e o espectro de fungos envolvidos variam amplamente entre diferentes países, mesmo nas diferentes regiões de um mesmo país. Essas variações ocorrem devido ao clima, idade, sexo, nível socioeconômico, circunstâncias, forma de inoculação, atividade agrícola e extensão da urbanização (Mahmoudi *et al.*, 2018). Fatores predisponentes são necessários para que se crie uma porta de entrada e ocorra o estabelecimento da infecção (Czakó *et al.*, 2019). O mais comum é o traumatismo ocular (Czakó *et al.*, 2019). Dentre os patógenos mais comuns temos leveduras do gênero *Candida* e fungos filamentosos tais como algumas espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* (Kaur e Kakkar, 2010; Słowik *et al.*, 2015; Ahmadikia *et al.*, 2021).

Fatores de virulência são essenciais no estabelecimento da infecção, estão diretamente associados à transição entre comensalismo e oportunismo e a uma redução da suscetibilidade (Cui *et al.*, 2015; Bujdáková, 2016; Silva *et al.*,

2017). A capacidade de o microrganismo infectar é mediada pela variabilidade de adaptação e os fatores de virulência, como a aderência e a formação de biofilme, secreção de enzimas hidrolíticas e as alterações morfológicas (Silva *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2015; Sakita *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). A formação de biofilme está fortemente associada a infecções recalcitrantes, uma vez que demonstraram tolerância aumentada frente ao sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, apresentam uma diminuição expressiva da suscetibilidade aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis, mesmo altas concentrações, inclusive centenas de vezes maiores em relação às necessárias para as suas respectivas células planctônicas (Nett, 2014; De Cremer *et al.*, 2015; Fuentesfria *et al.*, 2017). A terapia antifúngica destas infecções associadas ao biofilme apresenta-se, geralmente, ineficaz, uma causa significativa de morbidade e mortalidade (De Cremer *et al.*, 2015; Fuentesfria *et al.*, 2017). Logo, ocorre um agravamento em relação à limitação já existente associada ao arsenal terapêutico antifúngico atualmente disponível (De Cremer *et al.*, 2015).

Diagnóstico e tratamento imediatos são essenciais para salvar a visão do indivíduo (Durand, 2017). Até dois terços dos pacientes podem perder a visão, portanto, devem ser tratados imediatamente para prevenir tais consequências (Durand, 2013; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). O manejo desta condição (particularmente se ocorrerem lesões profundas) é problemático (Thomas e Kaliamurthy, 2013). A escolha da terapia antifúngica para o tratamento destas infecções deve ser racional, baseada na determinação do padrão de suscetibilidade do fungo isolado (Thomas e Kaliamurthy, 2013). Ainda, na determinação de um regime antifúngico apropriado, é essencial avaliar alguns aspectos do agente antifúngico proposto dentro do quadro clínico que é apresentado: capacidade de penetrar nos tecidos oculares, espectro de atividade e perfil de toxicidade (Patil e Majumdar, 2017).

A gravidade e a localização das infecções fúngicas oculares ditam a via de administração do medicamento (Lakhani *et al.*, 2019; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). No contexto atual, a terapia convencional para casos de ceratite fúngica ou demais infecções da região anterior da câmara, em sua maioria, são tratadas

pela administração de fármacos por via tópica (Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). A via tópica é a preferida para a administração de medicamentos no tratamento destas infecções oftálmicas considerando seus benefícios, como alta adesão do paciente, facilidade de uso, não invasividade, indolor, efeitos colaterais reduzidos e tratamento seletivo da câmara anterior (Lakhani *et al.*, 2019; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Infelizmente, as formas farmacêuticas tópicas enfrentam alguns desafios, como baixa penetração do fármaco, compostos com uma massa molecular > 500 daltons (Da) têm uma penetração muito baixa no epitélio corneano intacto. Além disso, existem outros desafios importantes associados, como a alta frequência de administração, baixo tempo de residência e toxicidade causada pelo uso de longo prazo (Kaur e Kakkar, 2010; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Até o momento, entretanto, não houve nenhum novo sistema de aplicação de antifúngico ocular tópico disponível aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) (Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Ocasionalmente lentes de contato contendo o ativo, com liberação gradual na superfície ocular, são utilizadas no tratamento de ceratite fúngica (Sahay *et al.*, 2019).

Em infecções fúngicas oculares mais profundas são necessárias outras vias além da tópica, como as vias parenterais ou intraoculares, intraestromal e intracameral, utilizadas em casos de ceratite fúngica profunda e recalcitrante (Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Casos com envolvimento escleral ou límbico, endoftalmite, perfuração iminente ou úlcera de córnea perfurada, casos pediátricos, casos recalcitrantes e casos de pacientes pós-ceratoplastia é utilizado o tratamento sistêmico ou oral com antifúngicos (Sahay *et al.*, 2019).

A escolha mais adequada para o tratamento de micoses oftálmicas tem como objetivo final preservar a visão, mas isso depende de um diagnóstico ágil e a eficiente administração da terapia antifúngica apropriada (Thomas, 2003a). Atualmente, a terapia de infecções fúngicas oculares é insatisfatória (Srinivasan, 2004). Com exceção da natamicina suspensão 5%, antifúngicos polienos e azóis, como anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol, voriconazol e

posaconazol são rotineiramente usados topicamente *off-label* no ambiente clínico (Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019).

Os antifúngicos polienos e azóis são conhecidos por exibir toxicidades oculares e sistêmicas, que se manifestam como um dos principais desafios associados ao seu uso terapêutico (Lakhani *et al.*, 2019). Essas classes de antifúngicos vêm ocupar um nicho importante na terapia antifúngica oftálmica devido ao seu amplo espectro de atividade, frente uma variedade de fungos filamentosos e leveduriformes (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019). Assim, eles têm sido usados como agentes terapêuticos de primeira linha para tratar infecções fúngicas oculares, tendo sua aplicação tópica como abordagem primária (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019). Ainda que, atualmente, a suspensão de natamicina (também conhecido como pimaricina) 5% seja a única formulação de uso tópico aprovada pelo FDA para o tratamento de infecções fúngicas oftálmicas (Kaur e Kakkar, 2010; Czako *et al.*, 2019; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). No entanto, o uso da terapia antifúngica ocular, principalmente tópica, tem sido um desafio devido às suas propriedades físico-químicas e à anatomia e fisiologia ocular, uma vez que, em muitos casos, exibem baixa penetração pela córnea, limitando sua utilidade em casos de infecções mais profundas (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019).

Cerca de um quarto dos pacientes terá falha da terapêutica farmacológica, mesmo naqueles casos em que é fornecido tratamento adequado, o que poderá ocasionar deficiência visual moderada ou grave e/ou irá necessitar de intervenções cirúrgicas, caras e, frequentemente, malsucedidas (Mills *et al.*, 2020). Embora tenham sido feitos muito avanços em relação ao tratamento destas infecções fúngicas oculares, 15-27% dos pacientes requer intervenção cirúrgica devido ao fracasso da terapia ou devido ao quadro avançado da doença (Thomas, 2003b). A ceratite micótica geralmente responde lentamente a terapia antifúngica, ao longo de um período de semanas. Sinais clínicos de melhora devem ser observados com cuidado (Thomas, 2003a; Thomas, 2003b; Thomas e Kaliamurthy, 2013).

A utilidade clínica dos agentes antifúngicos de uso nas infecções fúngicas oftálmicas tem sido desafiada por sua atividade seletiva, toxicidade, surgimento de resistência e resistência cruzada, além da deficiência de técnicas que apresentem uma correlação robusta *in vitro/in vivo* (Lakhani *et al.*, 2019). Esta problemática ocorre, importantemente, associada à liberação não uniforme do agente antifúngico do fluido lacrimal para os tecidos oculares. Dessa forma, pode ocorrer uma liberação irregular do ativo, podendo atingir níveis subterapêuticos. Até a próxima aplicação, esta concentração tecidual subinibitória pode se manter por períodos longos. Dessa forma, o paciente é exposto ao risco de efeitos tóxicos e/ou de falha terapêutica (Kaur e Kakkar, 2010). Outro fator significativamente associado é o tratamento empírico na grande maioria dos casos de infecções fúngicas oculares, baseado apenas nas características clínicas. Isso também está contribuindo para o mau prognóstico e resistência dos microrganismos (Mills *et al.*, 2020).

Para combater os desafios do futuro surgimento de resistência e resistência cruzada e para melhorar os resultados da farmacoterapia, é de suma importância o desenvolvimento de antifúngicos de nova geração e de novas moléculas/classes, com propriedades físico-químicas superiores aqueles disponíveis e um amplo espectro antifúngico e/ou agentes potencializadores. Outra opção são as combinações, com objetivo de aumentar a atividade contra cepas resistentes e/ou para reduzir a dose e a toxicidade associada (Lakhani *et al.*, 2019). Ainda, algumas outras questões no tratamento das infecções fúngicas oftálmicas também necessitam de solução, como o perfil de toxicidade, as vias de administração restritas, o espectro de ação limitado e baixa biodisponibilidade, principalmente no local alvo, bem como a extensa formação de biofilmes e emergência de novos patógenos (Kathiravan *et al.*, 2012; Ajani *et al.*, 2016; González-Lara *et al.*, 2017). Todas estas questões tornam a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos necessários e urgentes. A identificação de compostos com atividade antifúngica e frente ao biofilme, que sejam eficazes, com ação isolada ou em associação aos antifúngicos

convencionais ou que facilite a ação do sistema imunológico, é muito importante (Nett, 2014).

Desta maneira, a 8-hidroxiquinolina (8-HQ) e seus derivados significam alternativas importantes, uma vez que possuem variabilidade ampla de possíveis modificações, em várias posições da molécula de 8-HQ, logo, uma gama de funções biológicas, dentre elas, a atividade antifúngica (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016). Estas moléculas possuem capacidade de quelar íons metálicos e, em virtude de que estes apresentam função muito importante nos processos biológicos e que a sua homeostase é necessária na manutenção do equilíbrio, a quelação, entre vários fatores, é importante para a atividade farmacológica (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016).

O derivado de 8-HQ, 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil)sulfonamida, denominado como PH151, se encontra no depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI - número do registro: BR1020170146740) e já foi parcialmente caracterizado. Joaquim *et al.* (2019) demonstraram que este composto possui ação em fungos leveduriformes do gênero *Candida* e fungos dermatófitos, com potencial promissor. Já o clioquinol, um derivado halogenado de 8-HQ, o 5-cloro-7-iodo-quinolin-8-ol, utilizado anteriormente, entre as décadas de 50 e 70, como agente antiparasitário oral, no tratamento da amebíase intestinal (Mao e Schimmera, 2008). No entanto, houve relatos de neurotoxicidade (neuropatia mielo-óptica subaguda - SMON) em pacientes japoneses, dessa forma, a formulação oral foi retirada do mercado. Contudo, formulações tópicas ainda estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas e parasitárias (Mao e Schimmera, 2008; Bareggi e Cornelli, 2010). Ao longo dos últimos anos, dada a sua eficácia, estudos envolvendo o clioquinol vêm crescendo (Bareggi e Cornelli, 2010). Sua ação biológica inclui atividade antifúngica, amplamente estudada, com um espectro de ação amplo, incluindo espécies dos gêneros *Candida albicans* e não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*), *Microsporium* (*M. canis* e *M. gypseum*, hoje renomeado como *Nannizzia gypsea*) e *Trichophyton* (*T. mentagrophytes* e *T. rubrum*) (Pippi *et al.*, 2017; da Costa *et al.*, 2020).

Ainda baseado nas estratégias de combate aos fungos patogênicos, além das ações curativas, temos a questão das ações preventivas, que também são muito importantes, visto a gravidade que estas infecções podem apresentar. Os fungos são responsáveis por até 50% dos casos de ceratite ulcerativa, a qual está associada a inúmeros fatores de risco, dentre os quais, inclui-se cirurgia ocular, como a ceratoplastia (Słowik *et al.*, 2015). Em números, os dados tornam-se ainda mais significativos, visto que segundo a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), entre janeiro e março de 2023 foram realizados 3673 transplantes de córnea no Brasil e em setembro de 2023 a fila de espera chega a 22757 pacientes ativos (Registro Brasileiro de Transplantes). Ao longo da última década, houve aumento no número de procedimentos realizados, com projeções para aumento futuro. Estima-se o envelhecimento da população e um resultado direto desse crescimento será o aumento dos procedimentos de transplante de córnea (Kiatos *et al.*, 2017). Embora o transplante de córnea seja um procedimento altamente bem sucedido e, ainda que incomum, a ceratite infecciosa é uma complicação muito séria, que pode evoluir, ocasionando o acometimento de toda estrutura ocular (endoftalmite), comprometendo seriamente a visão do paciente (Davila e Mian, 2016).

Os fatores de risco relacionados à complicação infecciosa pós-transplante podem estar associados ao receptor (uso de corticoides, lentes de contato, outros), à técnica cirúrgica (ceratoplastia lamelar ou ceratoplastia penetrante tradicional) ou ao tecido do doador (Davila e Mian, 2016). O fator de risco mais importante é o tecido doador contaminado, que se encontra associado ao método de conservação do material e o tempo decorrido entre o óbito do doador e a remoção para condicionamento em meio de preservação (Davila e Mian, 2016). Medidas preventivas, como a vigilância da aquisição, o processamento e o armazenamento do tecido da córnea são vitais (Davila e Mian, 2016).

O armazenamento hipotérmico (2–8 °C) é o método mais amplamente utilizado mundialmente. O desenvolvimento de soluções como Optisol-GS estendeu ainda mais os tempos de armazenamento hipotérmicos, sendo amplamente utilizado em bancos de olhos dos EUA (Armitage, 2011). Destaca-

se por seu uso generalizado, preservando as córneas por até 14 dias a 4°C, boa preservação da morfologia celular e manutenção da espessura original da córnea (Faria e Sousa e Barretto, 2017). No Brasil, atualmente, são utilizados dois meios de preservação hipotérmicos: Optisol-GS® (Bausch+Lomb, Rochester, Nova Iorque, EUA) (contendo gentamicina-estreptomicina) e o Eusol-C® (AL.CHI.MI.A. Srl, Ponte San Nicolò, Padova, Itália) (contendo gentamicina), ambos importados. São usados, por até 14 dias, para manter a viabilidade endotelial da córnea, espessura, transparência do enxerto e acuidade visual pós-transplante. A presença dos antibacterianos é usada para prevenção de complicações bacterianas pós-transplante, no entanto, não há adição de antifúngicos (Pereira, 2011). Ainda que patógenos bacterianos sejam associados a esta fonte de infecção, estudos acerca destes meios constatou que a maior parte da contaminação presente é fúngica (62%) (Arbelaez *et al.*, 2015; Davila e Mian, 2016). Logo, além da problemática relacionada às infecções pós-operatórias, outro ponto importante a ser considerado são as contaminações microbiológicas que possam levar ao descarte do material, impactando na disponibilidade de tecido, na fila de espera para transplante e custos associados (Krajina *et al.*, 2022; Pregão N° 00010/2023). Apenas o meio de preservação em si já apresenta um custo elevado, um frasco de Optisol-GS® é comprado pelos centros de serviço de oftalmologia por um valor de cerca de R\$ 1250,00 e o meio Eusol-C® por um valor de cerca de R\$ 890,00 (Pregão N° 00010/2023). Desta forma, há a necessidade do desenvolvimento de um meio de preservação que seja atóxico e não irritante para a mucosa ocular, com espectro de ação antimicrobiano mais amplo em relação aos convencionais (incluindo patógenos fúngicos) a fim de mitigar estes problemas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um novo meio de preservação de córneas para transplante, com espectro de atividade mais amplo em relação aos já existentes, abrangendo a ação antifúngica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Determinar o perfil de atividade antifúngica de cinco compostos (três agentes antifúngicos comerciais e dois potenciais agentes antifúngicos derivados de 8-hidroxiquinolina): natamicina, anfotericina B, voriconazol, clioquinol e PH151 frente a cepas (algumas de origem de infecções oculares) dos principais gêneros fúngicos associados às infecções oftálmicas: *Fusarium* e *Candida*;

2.2.2. Avaliar a interação entre os cinco compostos em questão em diferentes combinações duplas, triplas e quádruplas frente a cepas dos principais gêneros fúngicos associados às infecções oftálmicas;

2.2.3. Determinar a cinética de morte da melhor combinação frente a duas representativas de cada gênero;

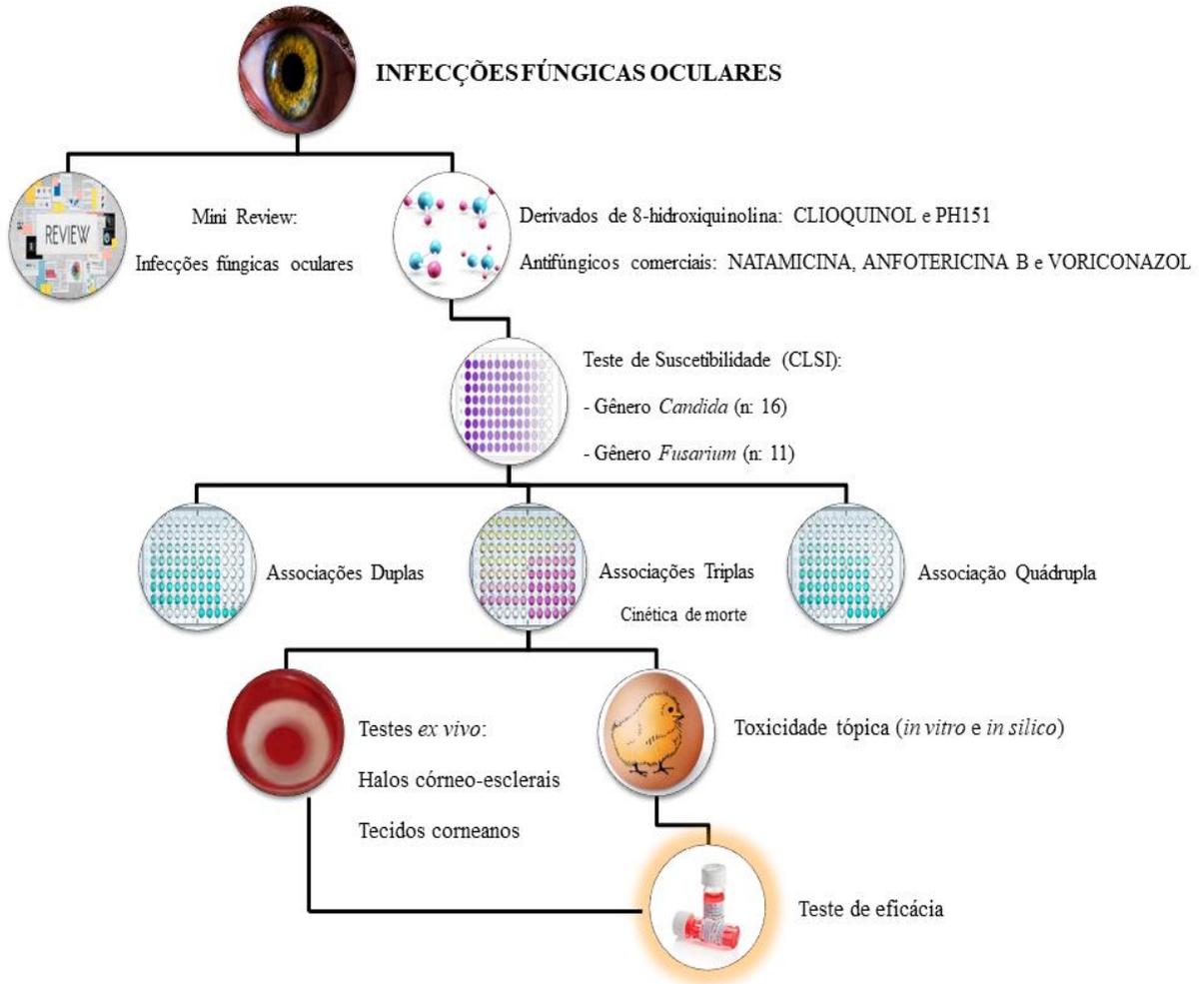
2.2.4. Determinar o perfil de toxicidade tópico dos compostos isolados e da(s) melhor(es) associação(ões), com o intuito de verificar, *in vitro* e *in silico*, sua segurança;

2.2.5. Determinar a capacidade de formação de biofilme das cepas utilizadas e atividade de inibição da formação de biofilme sobre tecido córneo-escleral dos compostos isolados e da(s) melhor(es) associação(ões);

2.2.6. Determinar a eficiência de ação microbiológica da melhor combinação em condições de armazenamento do meio de preservação;

2.2.7. Avaliar através de Microscopia a adesão fúngica ao tecido da córnea e capacidade da melhor combinação em inibir este processo.

3. MAPA CONCEITUAL



4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. INFECÇÕES FÚNGICAS

Embora a grande maioria das infecções fúngicas sejam subdocumentadas no mundo, estima-se que acometam cerca de 1 bilhão de indivíduos anualmente e encontram-se associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade (Calderone *et al.*, 2014; Fuentefria *et al.*, 2017; González-Lara *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2017). A incidência de infecções fúngicas vem aumentando à medida que os fatores de risco predisponentes a estas infecções também aumentam. As condições mais comuns, como situações de imunocomprometimento (quimioterapias, transplante de órgãos, vírus da imunodeficiência humana [do inglês HIV]), avanços com anticorpos monoclonais, uso de dispositivos médicos, uso amplo de antimicrobianos, terapia corticosteroide e, atualmente, pacientes internados com Covid-19 (infecção por SARS-Cov-2), aumentam o número de pacientes em risco de infecções oportunistas (Pappas *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2018; Mehrandish e Mirzaeei, 2021; Musuuza *et al.*, 2021; Spallone e Schwartz, 2021). O surgimento de novas infecções em humanos, plantas e animais, bem como de doenças infecciosas resistentes, é amplificado por mudanças de hospedeiros, globalização, urbanização, comércio, destruição de habitats e perda de biodiversidade. Além disso, o uso excessivo de agentes antifúngicos na medicina e na agricultura levou a um surgimento mundial sem precedentes de patógenos fúngicos resistentes a grande maioria dos agentes antifúngicos. A emergência e reemergência dos patógenos fúngicos continuarão à medida que nosso planeta enfrenta as consequências da ação antropogênica, principalmente ambiental, e das mudanças climáticas (Spallone e Schwartz, 2021).

Os fungos são considerados “um perigo silencioso”, uma vez que a estimativa anual de mortes pode chegar a mais de dois milhões de pessoas, ultrapassando o número de mortes por malária ou tuberculose. Contudo, a maioria nunca é diagnosticada. O diagnóstico limitado e a medição deficiente da morbidade da doença fúngica significam que a verdadeira escala do problema é

desconhecida. Segundo o *Global Action Fund for Fungal Infections* a estimativa acerca das infecções fúngicas graves, em nível mundial, é de mais de 300 milhões de casos anualmente, com 25 milhões de casos onde o paciente corre alto risco de morrer ou perder a visão. Conforme a GAFFI, estima-se que com diagnóstico e tratamento mais amplamente disponíveis, o número de mortes pode cair para menos de 750.000. Um importante exemplo de infecções fúngicas de rápida progressão e comprometimento são as oculares, visto que podem ocasionar perda significativa da visão ou mesmo servirem de porta de entrada para uma infecção sistêmica e fatal (Słowik *et al.*, 2015).

4.1.1. INFECÇÕES FÚNGICAS OCULARES

Anualmente, as infecções fúngicas oculares afetam mais de um milhão de pessoas em todo o mundo, podendo chegar a 2.000.000, e vem apresentando um aumento significativo nas últimas décadas devido ao aumento do número de pacientes com imunossupressão adquirida secundária ao uso prolongado de agentes imunossupressores, antibióticos de largo espectro de longo prazo, uso de lentes de contato (Srinivasan, 2004; Kalkanci e Ozdek, 2010; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Infecções fúngicas oculares vem sendo cada vez mais reconhecidas como importante causa de morbidade e cegueira, podendo, em alguns casos específicos, representar risco de vida (Thomas 2003a). São menos comuns do que as infecções com bactérias ou vírus, mas geralmente são graves e podem levar à perda de visão. O diagnóstico normalmente é tardio devido ao início gradual de sintomas e tratamento empírico com antibacterianos (Kaur e Kakkar, 2010; GAFFI). Logo, o desfecho é grave na maioria dos casos, com cegueira em até 60% dos casos (> 600.000) e/ou necessidade de remoção do globo ocular (GAFFI). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), infecções da córnea são uma das principais causas de perda de visão, perdendo apenas para a catarata em importância geral. É uma doença devastadora, considerada a segunda causa mais comum de cegueira em países em desenvolvimento (Srinivasan, 2004; Kaur e Kakkar, 2010; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). O olho é um órgão complexo dividido em duas partes: câmara

anterior e posterior, ambas as quais podem ser afetadas por estas infecções (Mehrandish e Mirzaeei, 2021).

4.1.1.1. ANATOMIA OCULAR

O aparelho visual é composto por um conjunto sensorial (constituído pelo olho, via óptica e centros visuais) e um conjunto não sensorial (constituído pelos vasos e nervos). A anatomia do globo ocular é complexa, ele encontra-se na órbita (cavidade óssea). A órbita juntamente com estruturas associadas como pálpebras, supercílios (sobrancelhas), conjuntiva e aparelho lacrimal, são responsáveis pela proteção do globo ocular, enquanto a mobilidade é assegurada pelos músculos oculomotores (Helene e Helene, 2011; Maia NCdeF, 2018).

A córnea é a parte transparente, frontal, do nosso olho, cuja função é refratar e transmitir a luz. Representa uma barreira física entre as estruturas internas do olho e o meio ambiente. A ausência de queratina no epitélio, de vasos sanguíneos, de vasos linfáticos e de pigmentos, em conjunto com a turgescência tecidual adequada e com organização estruturada de fibras colágenas interagindo com proteoglicanos, possibilitam a transparência do tecido. Apresenta uma espessura média de 0,520 mm na região central e de 0,650 mm na região periférica (Helene e Helene, 2011). A medida dessa espessura é capaz de avaliar a integridade estrutural e fisiológica corneana. Embora seja uma estrutura avascular, com a nutrição ocorrendo por difusão a partir do humor aquoso, possui filetes nervosos, muito finos e transparentes, que lhe garantem uma enorme sensibilidade tátil e dolorosa (Bicas, 1997; Maia NCdeF, 2018).

A córnea possui seis camadas anatômicas (Singh *et al.*, 2019). O mais anterior é o epitélio, constituído por células escamosas, células alares e células basais. Apresenta alta capacidade de regeneração e é recoberta por uma fina película de lágrima, o que lhe confere proteção contra o ressecamento. A córnea funciona como uma espécie de barreira contra a perda de líquidos e penetração de microrganismos, com propriedade de uma membrana semipermeável (Bicas, 1997; Singh *et al.*, 2019). A segunda camada é a membrana de Bowman, formada por fibras de colágeno e proteoglicanas

densamente entrelaçadas, muito resistente a traumatismos e invasões bacterianas. Esta camada tecidual não se regenera, dessa forma, o dano tem por consequência a perda de sua transparência e como cicatriz deixa um processo fibrótico opaco, sua função é manter a integridade e a organização epitelial (Bicas, 1997). Este tecido apresenta fibras nervosas responsáveis pela inervação sensitiva da córnea. O estroma constitui a maior parte da córnea e contém ceratócitos e lamelas de colágeno que são densamente distribuídos no estroma anterior em comparação com o posterior. Esta camada tecidual corresponde a cerca de 90% da espessura total da córnea, garante elevado poder refrativo da córnea. Quando lesado, reorganiza-se de modo irregular, formando cicatrizações esbranquiçadas (leucomas). No estroma, estão presentes os ceratócitos, células inflamatórias e outras células do sistema imune, principalmente os linfócitos. A camada de Dua tem quase 10-15 μm de espessura e permanece fortemente aderida às fibras estromais subjacentes, com importante papel de resistência e impermeabilidade ao ar (Bicas, 1997; Maia NCdeF, 2018; Singh *et al.*, 2019). A membrana de Descemet fornece uma base para as células endoteliais que têm um papel fundamental na manutenção da transparência da córnea e têm demonstrado um espessamento ao longo da vida, passando de 2-3 μm , no nascimento, a cerca de 10-12 μm em indivíduos adultos. Essa membrana é facilmente regenerada. Ela separa a córnea do humor aquoso e atua como uma bomba ativa para transporte de íons e água para a câmara anterior (Bicas, 1997; Maia NCdeF, 2018; Singh *et al.*, 2019). O endotélio em contato com o humor aquoso dá passagem a nutrientes para as outras estruturas da córnea, suprimento de glicose e oxigênio. Ele possui capacidade de regeneração, porém a mitose em células endoteliais adultas é escassa e lenta, então, quando há perda de células endoteliais, as remanescentes “deslizam” em direção à área lesada para ocupá-la, aumentando de tamanho e alterando a sua forma. A integridade funcional do endotélio corneano é essencial para manter a transparência e organização das camadas da córnea, evitando o edema corneano (Bicas, 1997) (Conforme apresentado na FIGURA 1).

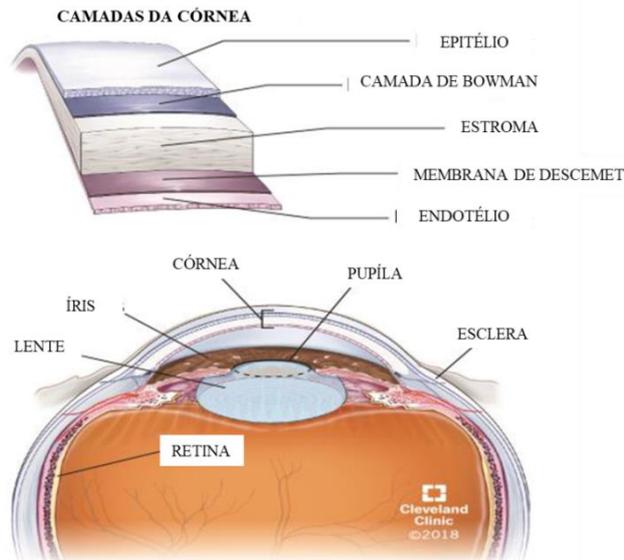


Figura 1. Apresenta algumas das estruturas do globo ocular, com destaque para as camadas que compõe o tecido corneano (Adaptado de my.clevelandclinic.org).

4.1.1.2. FORMAS CLÍNICAS: CARACTERÍSTICAS

As infecções fúngicas oculares podem envolver a córnea (ceratite), que é a apresentação mais frequente, mas a órbita, pálpebras, aparelho lacrimal, conjuntiva, esclera e estruturas intraoculares (interior do olho – endoftalmite - exógena pela introdução do patógeno de uma fonte externa e endógena inicia por uma fonte interna) também podem ser atingidos (Thomas, 2003a; Kaur e Kakkar, 2010; Słowik *et al.*, 2015). As principais formas clínicas estão representadas na FIGURA 2.



Figura 2. As três principais formas clínicas de infecções fúngicas oculares: A) ceratite; B) endoftalmite endógena; C) endoftalmite exógena (Adaptada de: Mitani *et al.*, 2014; Kah *et al.*, 2011; Merchant *et al.*, 2001).

Os fungos não conseguem penetrar o epitélio corneano intacto e não alcançam a córnea pelos vasos limbiais episclerais. Eles necessitam de uma lesão penetrante ou um defeito epitelial anterior de maneira a estabelecer uma porta de entrada. No entanto, uma vez dentro da córnea eles são capazes de se estabelecer e proliferar rapidamente (Kaur e Kakkar, 2010). O estabelecimento da infecção fúngica ocular, principalmente a endoftalmite, depende de alguns fatores relacionados ao hospedeiro, como a resposta imunológica (resposta imune celular), do tamanho do inóculo e patogenicidade do fungo (Durand, 2017; Mills *et al.*, 2020). Dentre as cirurgias de catarata, apenas 1 em 500-1000 resultam em endoftalmite, provavelmente devido à capacidade do sistema imunológico de eliminar inóculos pequenos e a constante renovação do aquoso (a cada 100 minutos). A comunicação com o vítreo, que não se regenera, pode aumentar o risco de endoftalmite pós-operatória (Durand, 2017). O risco é ainda maior quando há a introdução de um grande inóculo do patógeno no olho, pois pode sobrecarregar o sistema de defesa do hospedeiro (Durand, 2017). A maioria das infecções fúngicas oculares resulta em alta morbidade, que está importantemente associada a fatores, como o dano físico ocasionado pela própria presença do patógeno fúngico, a resposta gerada pelo hospedeiro e a resposta inflamatória leucocítica infiltrativa, substâncias fúngicas produzidas e o dano secundário de toxinas e enzimas fúngicas (Kaur e Kakkar, 2010). Logo, a patogênese das infecções oculares também é ligada à epidemiologia da doença (Kalkanci e Ozdek, 2010).

A ceratite fúngica apresenta-se como lesões supurativas graves, geralmente ulcerativas e com a presença de hipópio, um depósito de leucócitos e células necróticas na câmara anterior formando um nível inferior pela gravidade (Thomas, 2003b; Srinivasan, 2004; Thomas e Kaliamurthy, 2013; Durand, 2017). Placa endotelial e hipópio geralmente não ocorrem dentro da primeira semana, contudo, a presença de hipópio em uma úlcera indolente pode sugerir uma etiologia fúngica (Thomas, 2003a). Infiltrados branco-acinzentados ou branco-amarelados, com bordas difusas ou com margens irregulares emplumadas são as características clínicas normalmente observadas. Podem ser observadas linhas

que se estendem além da borda da úlcera, a base desta apresenta frequentemente exsudatos cremosos e bordas elevadas. A infiltração celular é mínima no estroma adjacente, irite é leve, mas apresenta textura áspera e seca, área necrótica elevada e dobras de Descemet (Thomas, 2003 A; Srinivasan, 2004). Lesões satélite, "anel imune" e abscesso posterior da córnea são vistos raramente (Thomas, 2003a; Srinivasan, 2004). A ausência de edema na pálpebra é uma característica comum (Srinivasan, 2004). Representa um desafio devido a sua tendência em imitar outros tipos de inflamação do estroma (Thomas, 2003b). Em alguns casos, pode-se observar a presença de hifas fúngicas dentro do estroma corneano (Thomas e Kaliamurthy, 2013). As infecções fúngicas da córnea precisam ser prontamente reconhecidas para favorecer a recuperação. Embora os sintomas sejam, geralmente, inespecíficos, são habitualmente mais prolongados em relação à infecção na córnea por bactérias (Thomas, 2003b).

A infecção por fungo na córnea pode levar a endoftalmite à medida que o fungo cresce e dissemina através da córnea e no humor aquoso (Durand, 2013). O termo "endoftalmite" refere-se à infecção do vítreo e/ou aquoso por bactérias ou fungos. Dessa forma, endoftalmite pode ser uma das infecções oculares mais devastadoras e levar a cegueira irreversível horas ou dias após o início dos sintomas (Durand, 2017). Quando endoftalmite vem de complicação da ceratite, muitas vezes podem ser vistos filamentos que se estendem da parte posterior da córnea para o humor aquoso. Em alguns casos pode haver vitrite (Durand, 2013; Thomas e Kaliamurthy, 2013). O sintoma mais comum de endoftalmite, em quase todos os pacientes, é o decréscimo da visão. Embora não seja uma reclamação universal, dor ou desconforto ocular e vermelhidão também são sintomas comuns. Sintomas a nível sistêmico, tal como febre, estão normalmente ausentes na endoftalmite exógena, porém são frequentes na endoftalmite endógena (Durand, 2017). Hipópio pode ser observado na maioria dos casos (Thomas, 2003b; Thomas e Kaliamurthy, 2013; Durand, 2017). A etiologia da doença bacteriana ou fúngica pode ter, inicialmente, o diagnóstico direcionado de acordo com o ritmo dos sintomas e o tipo de inflamação intraocular. A endoftalmite bacteriana geralmente se manifesta após dias do evento

desencadeante, ou seja, se apresenta de forma aguda. Já a endoftalmite fúngica geralmente tem uma piora dos sintomas ao longo de dias a semanas, uma apresentação subaguda, e a inflamação intraocular tende a ocorrer em "grumos" dentro do aquoso e/ou vítreo (Durand, 2013; Durand, 2017). Em populações mais vulneráveis, como imunocomprometidos, a endoftalmite pode disseminar (Debourgogne *et al.*, 2016; Kauffman, 2016; Relhan *et al.*, 2018).

A incidência de infecções oculares no mundo, principalmente ceratite, aumentou importantemente, levando os especialistas em córnea a recomendar o status de 'Doença Tropical Negligenciada' (Mills *et al.*, 2020). Esta infecção já foi considerada mais comum na população mais velha, dos 51 aos 60 anos. Contudo, relatórios de subpopulações indianas indicam subgrupos mais jovens, de 31 a 40 anos, seguido por 21 a 30 anos, como os mais afetados. Considerando que esta faixa etária concentra a maioria da população economicamente ativa, há um forte impacto econômico oriundo da morbidade associada a esta infecção, como a perda total da visão (Srinivasan, 2004; Kaur e Kakkar, 2010). Com uma frequência crescente, os fungos são responsáveis por 1-45% das ceratites infecciosas, com variações de acordo com a distribuição geográfica (Mills *et al.*, 2020). Enquanto a incidência de ceratite fúngica na zona temperada varia de 6 a 20%, em regiões de clima tropical pode chegar a 50% (Czakó *et al.*, 2019). Além da incidência e da prevalência de infecções fúngicas oculares e o espectro de fungos envolvidos variarem amplamente de país para país, esta variação também ocorre entre diferentes regiões dentro de um mesmo país, devido ao clima, idade, sexo, nível socioeconômico, atividade agrícola e extensão da urbanização, forma de inoculação (Mahmoudi *et al.*, 2018).

4.1.1.3. TIPOS DE INFECÇÕES: PORTAS DE ENTRADA E AGENTES ETIOLÓGICOS

Os fungos são oportunistas no olho, pois raramente infectam tecidos oculares que estejam saudáveis e intactos (Thomas, 2003a). Uma vez que os microrganismos não atravessam o epitélio corneano intacto, fatores predisponentes são necessários para que se crie uma porta de entrada e ocorra o

estabelecimento da infecção (Czakó *et al.*, 2019). O mais comum é o traumatismo ocular, principalmente de origem vegetal ou corpo estranho contaminado com o solo (Czakó *et al.*, 2019). Outros fatores de risco incluem o uso de lentes de contato, seja pela lesão epitelial da córnea e/ou pelo contato com solução contaminada, cirurgia oftálmica, doença da superfície ocular e corticoterapia, tanto sistêmica como tópica, e doenças imunossupressoras (Kaur e Kakkar, 2010; Czakó *et al.*, 2019).

Na ceratite fúngica, há uma especial ocorrência de casos em trabalhadores rurais ou outro trabalho ao ar livre, principalmente jovens saudáveis, em consequência da inoculação traumática de material contaminado por fungos (40-60% dos pacientes) (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Mills *et al.*, 2020). Vários agentes traumatizantes ou abrasivos do epitélio foram relatados, incluindo matéria vegetal, lama ou partículas de poeira, grãos de arroz, galhos de árvores e corpos estranhos metálicos. Houve relatos de ceratite fúngica por *Curvularia* sp. e *F. oxysporum* associada ao uso de cortadores de grama de linha de náilon (Thomas, 2003a; Thomas e Kaliamurthy, 2013). Assim, espécies filamentosas e saprofíticas constituem o grupo dominante de patógenos nestes casos (Klotz *et al.* 2000; Kalkanci e Ozdek, 2010). Desde a década de 1980, o uso de lentes de contato tem sido implicado como um fator de risco para ceratite (Kalkanci e Ozdek, 2010). Atualmente, vem sendo reconhecido entre os principais fatores de risco (Mahmoudi *et al.*, 2018).

A endoftalmite exógena ocorre pela inoculação do patógeno da superfície ocular ou advindo de outras fontes externas e representa a maioria dos casos de endoftalmite (Durand, 2017; Relhan *et al.*, 2018; Lupia *et al.*, 2020). Geralmente ocorre após cirurgias oculares e procedimentos clínicos invasivos, de forma pós-traumática, bem como pode ocorrer como complicação de ceratite (Durand, 2017; Lupia *et al.*, 2020). De acordo com os fatores de risco associados, a endoftalmite exógena é dividida em várias categorias, dentre elas: superfície ocular (endoftalmite pós-operatória, pós-injeção, relacionada à ceratite, à bolha ou relacionada a um dispositivo) ou de ambiente (endoftalmite pós-traumática). A categoria relacionada influencia na apresentação característica, microbiologia

associada e desfecho da visão, bem como a taxa de incidência (Durand, 2017). Casos de endoftalmite exógena pós-operatório (principalmente pós-catarata) representam de 40 a 80% dos casos. Já casos pós-traumáticos compreendem 2 a 15%, no entanto, se consideradas as diferenças regionais dentro de um território, podem ser responsáveis por até 40 a 60% dos casos. Com a aprovação pelo FDA de tratamentos de patologias oculares com administrações de injeções intravítreas, a endoftalmite pós-injeção passou a ser mais comum do que endoftalmite pós-operatória (Durand, 2017; Lupia *et al.*, 2020).

A endoftalmite endógena inicia, geralmente, através da disseminação hematogênica, a fonte de infecção pode ser um foco transitório (cateter venoso central permanente) ou em curso (abcesso hepático) (Klotz *et al.*, 2000; Durand, 2017). A epidemiologia da endoftalmite fúngica endógena encontra-se intrinsecamente relacionada à capacidade de determinadas espécies fúngicas de disseminar-se pela via hematológica a partir de um foco infeccioso (Chakrabarti *et al.*, 2008; Durand, 2013). Há um risco superior de desenvolvimento deste tipo de infecção ocular por fungos patogênicos em pacientes imunossuprimidos, devido a sua incapacidade de elaborar uma resposta imune adequada frente ao agente agressor (Klotz *et al.*, 2000; Durand, 2013; Durand, 2017). Ocorrem especialmente em pacientes HIV positivo, pós-transplante, em uso de imunossupressores, com infecção generalizada, neutropênicos, usuários de drogas injetáveis, diabéticos e/ou que necessitam de acesso venoso central permanente, nutrição parenteral, antibióticos de amplo espectro, glicocorticoides (Klotz *et al.*, 2000; Chakrabarti *et al.*, 2008; Durand, 2013; Durand, 2017).

A patogênese das infecções oculares é ligada à epidemiologia da doença, além disso, deve-se levar em consideração a virulência intrínseca dos fungos (Kalkanci e Ozdek, 2010; Kaur e Kakkar, 2010). Esta, por sua vez, depende das substâncias fúngicas produzidas (toxinas, enzimas) e a resposta do hospedeiro gerada (resposta inflamatória), ainda têm o próprio dano físico local (Kaur e Kakkar, 2010). O patógeno mais comum que invade um defeito pré-existente no tecido ocular é a *Candida* spp., já os fungos filamentosos são a principal causa de infecção pós-traumática (Kaur e Kakkar, 2010). Fungos filamentosos,

principalmente *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp., e leveduras, como espécies de *Candida*, são as causas predominantes de infecções fúngicas oculares na maior parte do mundo (Kaur e Kakkar, 2010; Słowik *et al.*, 2015; Ahmadikia *et al.*, 2021). As infecções fúngicas oculares têm alta prevalência, especialmente em países em desenvolvimento com clima quente e úmido (Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Nas regiões tropicais e subtropicais, os fungos filamentosos são predominantes, embora se acredite que em climas temperados as leveduras sejam mais frequentes (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2018).

4.1.1.3.1. CERATITE

As ceratites fúngicas são ocasionadas tanto por patógenos fúngicos filamentosos (especialmente espécies de *Fusarium* e de *Aspergillus*) como patógenos leveduriformes (particularmente espécies de *Candida*) (Thomas, 2003b; Mahmoudi *et al.*, 2018; Mills *et al.*, 2020). São infecções que apresentam distribuição global. A incidência e prevalência e o espectro de fungos envolvidos na infecção estão relacionados, além da forma de inoculação do agente, aos fatores de risco do paciente, condições geográficas, nível socioeconômico e condições climáticas da região (Klotz *et al.*, 2000; Mahmoudi *et al.*, 2018). Dessa forma, variam amplamente entre países, mesmo em diferentes regiões de um mesmo país, de acordo com as características da região, como clima (chuvas anuais e variação de temperatura), idade populacional, sexo, nível socioeconômico, atividade agrícola e extensão da urbanização (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2018). Estas infecções respondem por quase 50% das ceratites microbianas encontradas em países de renda média baixa e afetam, predominantemente, trabalhadores do setor primário, predominantemente agricultores (Liu *et al.*, 2019; Mills *et al.*, 2020). As ceratites fúngicas são relativamente raras em regiões de clima temperado e em países desenvolvidos (menos de 10%), como Grã-Bretanha e norte dos Estados Unidos. Contudo, são responsáveis por quase metade das ceratites infecciosas em países tropicais e subtropicais, bem como em muitos países em desenvolvimento, podendo atingir níveis próximos a 50% dos casos (Kalkanci e Ozdek, 2010; Thomas e Kaliamurthy, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2018; Sahay *et al.*, 2019). Estas

infecções estão entre as principais patologias oculares que ocasionam cegueira no território da Ásia (Kalkanci e Ozdek, 2010; Mahmoudi *et al.*, 2018). No sul da Índia, onde 44% de todas as úlceras de córnea são causadas por fungos e na China, detectou-se um aumento da incidência de ceratite fúngica a partir da década de 90 (Srinivasan, 2004). As maiores incidências de ceratite microbiana foram encontradas no sul da Índia e no Nepal, com incidência anual de 113 e 799 por 100.000 indivíduos, respectivamente. Já em países como Estados Unidos, Reino Unido e Dinamarca, as incidências anuais encontradas foram de 11 por 100.000 indivíduos, 0,3 e 0,6 por milhão de pessoas, respectivamente (Mahmoudi *et al.*, 2018). Ainda, um estudo demonstrou uma correlação inversa estatisticamente significativa entre a renda nacional bruta e o percentual de isolados fúngicos (Thomas e Kaliamurthy, 2013).

Em países industrializados, um importante fator de risco para ceratite fúngica é o uso de lentes de contato, associado a até 29% dos casos. Espécies de *Candida* encontram-se entre as principais causas da ceratite fúngica associada a lentes de contato terapêuticas, enquanto os fungos filamentosos são associados ao uso de lentes de contato corretivas (Kaur e Kakkar, 2010). Importaneamente, tem-se a questão climática influenciando na prevalência fúngica nos casos de ceratite fúngica. Regiões de clima caracteristicamente quente e úmido, como as regiões tropicais, favorecem o desenvolvimento de fungos filamentosos, além da base econômica dos países, como os asiáticos, que é pautada na agricultura. Contrariamente, em áreas urbanas, com clima frio, como regiões de clima temperado, há uma maior prevalência de agentes leveduriformes (Liu *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Além disso, há uma aparente relação entre a frequência de isolamento de determinadas espécies fúngicas e as variações sazonais de temperatura, umidade e vento das respectivas regiões (Thomas e Kaliamurthy, 2013). No golfo do México, o fungo anemófilo *Curvularia* spp. é mais frequentemente isolado nos meses de verão, com dias quentes e úmidos, quando ocorre o aumento da propagação dos seus esporos pelo ar (Thomas e Kaliamurthy, 2013). Um estudo no Brasil apresentou a associação significativa entre umidade relativa reduzida e vendas de antifúngicos para infecções oculares,

o que foi interpretado como uma distribuição sazonal de ceratite fúngica. Maior incidência foi observada durante o período onde o clima é mais seco e a atividade na agricultura é mais intensa (Thomas e Kaliamurthy, 2013). Os fungos de maior frequência presentes no ambiente também são frequentemente encontrados como comensais transitórios no saco conjuntival, em percentual variável de olhos saudáveis. Esses fungos podem tornar-se virulentos para a córnea em determinadas situações, como em traumas ou com o uso de corticosteróides (Thomas, 2003a).

Mais de 100 espécies de fungos foram documentadas como patógenos responsáveis por causar ceratite (Mahmoudi *et al.*, 2018). Sabe-se que *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Curvularia* spp. são os principais agentes etiológicos em regiões de clima tropical, principalmente associados a trauma ocular (matéria vegetal) (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2018; Mills *et al.*, 2020). Assim como outras espécies filamentosas, como *Scedosporium apiospermum*, *Paecilomyces* spp., *Acremonium* spp., *Penicillium* spp., *Microsporum* spp. *Epidermophyton floccosum*, *Scytalidium dimidiatum*, *Exophiala jeanselmei*, *Pseudallescheria boydii*, *Helminthosporium* spp., espécies de *Phialophora* e *Bipolaris* spp., embora estas de menor prevalência (Thomas, 2003a; Kalkanci e Ozdek, 2010; Thomas e Kaliamurthy, 2013). Em contrapartida, estruturas leveduriformes, especialmente *Candida* spp., tendem a manifestarem-se em zonas temperadas do globo (Ong *et al.*, 2016; Mahmoudi *et al.*, 2018). *Candida* spp. tende a ser predominante em países temperados e em pacientes com algum tipo de modificação da superfície ocular que predispõe a ceratite (Mahmoudi *et al.*, 2018). A infecção pode ter origem em alterações oculares (como a secreção lacrimal insuficiente) ou pode sobrevir de um defeito epitelial pré-existente devido à ceratite por herpes ou devido a escoriações causadas por lentes de contato (Thomas, 2003a; Thomas e Kaliamurthy, 2013). Normalmente, pacientes nessas regiões com ceratite por *Candida albicans* apresentam previamente algum comprometimento da estrutura ocular, incluindo condições sistêmicas como diabetes e imunossupressão (Thomas, 2003a; Thomas

e Kalamurthy, 2013). *Sporothrix schenckii*, um fungo dimórfico, também já foi associado a casos de ceratite fúngica (Kalkanci e Ozdek, 2010).

4.1.1.3.2. ENDOFTALMITE EXÓGENA

Nos casos de endoftalmite exógena os microrganismos fúngicos responsáveis pela infecção apresentam uma variação significativa da sua frequência a depender dos diversos fatores de risco, das condições climáticas e geográficas da região, da forma de inoculação e da imunocompetência dos sistemas de defesa do indivíduo (Buchta *et al.*, 2014). Há uma grande participação de espécies oportunistas (Silva *et al.*, 2015). O escopo de agentes fúngicos documentados por desencadear a doença invasiva é vasto, com evidências de níveis variáveis de virulência (Gupta *et al.*, 2006). Em regiões de clima tropical, os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* apresentam-se de forma relevante como agentes fúngicos mais frequentes no desenvolvimento dessa infecção (Wykoff *et al.*, 2008; Durand, 2013; Buchta *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019), uma vez que são microrganismos ubíquos comumente encontrados no solo e no ar (Buchta *et al.*, 2014; Lupia *et al.*, 2020). Contudo, outros fungos, como espécies de *Curvularia*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Scedosporium*, *Colletotrichum*, *Pseudallescheria*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Fonsecaea*, *Candida*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Phialophora*, *Rhinochlamydia*, *Exophiala* e *Sporothrix* também são descritos como patógenos responsáveis por estas infecções (Chakrabarti *et al.*, 2008; Kalkanci e Ozdek, 2010; Wykoff *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Apesar de manifestarem-se com menor frequência, podem igualmente desencadear processos infecciosos significativos (Buchta *et al.*, 2014). Por serem, em maioria, fungos ubíquos e/ou saprofíticos, a origem da contaminação pode muitas vezes estar na solução de irrigação intraocular e nos instrumentos utilizados durante a performance cirúrgica, nas próteses de lentes intraoculares e nos sistemas de ventilação hospitalar (Chakrabarti *et al.*, 2008). No caso de infecções por leveduras do gênero *Candida*, embora *C. albicans* seja normalmente mais prevalente, *Candida parapsilosis* é a espécie mais comum em surtos pós-cirúrgicos, pois parece sobreviver bem em fluidos de irrigação e em materiais protéticos (Durand, 2013). As causas da endoftalmite exógena,

especialmente em grupos pós-cirúrgico, são principalmente espécies de *Candida*, enquanto as espécies de *Fusarium* são relacionadas, principalmente, em pacientes pós-traumáticos e pós-ceratite (Kalkanci e Ozdek, 2010). Os patógenos fúngicos na endoftalmite pós-traumática são semelhantes aqueles relacionados à ceratite fúngica, uma vez que a endoftalmite exógena pode ser resultado da complicação de uma ceratite (Kalkanci e Ozdek, 2010). Como ocorreu entre 2004 e 2006, quando houve um surto internacional de ceratite por *Fusarium* sp., onde cerca de 6% dos casos evoluíram para endoftalmite. Este surto foi associado a uma marca de solução de limpeza de lentes de contato (Durand, 2013).

4.1.1.3.3. ENDOFTALMITE ENDÓGENA

A endoftalmite endógena geralmente se desenvolve em pacientes imunocomprometidos, com doença sistêmica crônica subjacente, uma septicemia associada à terapia antibacteriana de amplo espectro, hiperalimentação intravenosa com cateteres internos crônicos ou um transplante de órgão que requer imunossupressão (Kalkanci e Ozdek, 2010). Os fungos mais frequentemente identificados são as espécies do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans* em pacientes hospitalizados (Klotz *et al.*, 2000; Kalkanci e Ozdek, 2010; Durand, 2013). A endoftalmite pode ocorrer como uma complicação da candidemia pela disseminação hematogênica, portanto, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, também podem ser agentes de endoftalmite, e normalmente sucede-se em pacientes hospitalizados, com consequências potencialmente devastadoras (Lashof *et al.*, 2011). A incidência de espécies fúngicas filamentosas, oportunistas ou patogênicas, capazes de cruzar a barreira hemato-ocular, aumentou nos últimos 20 anos. Grande parte desse crescimento está relacionado ao envelhecimento da população e ao desenvolvimento de terapias invasivas e agressivas, além da elevação do número de pacientes imunossuprimidos. Assim, abre-se margem para que patógenos oportunistas, como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *C. neoformans*, adentrem o sistema hematogênico por rompimento das barreiras de defesa natural e/ou enfraquecimento da resposta imune, chegando ao globo ocular (Vilela *et al.*, 2013). Espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* podem se tornar agentes

etiológicos comuns, uma vez que pacientes hospitalizados com fungemia possuem quadros graves e disseminados (Durand, 2013). Já foram identificados casos de endoftalmite endógena por espécies de *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. glaucus* e *A. nidulans*), *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Pseudallescheria* sp., espécies de *Cryptococcus*, fungos dimórficos *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*, mesmo em indivíduos aparentemente saudáveis (Kalkanci e Ozdek, 2010; Vilela *et al.*, 2013).

Foram relatados ao menos 166 gêneros fúngicos relacionados às infecções oftálmicas, com cerca de 144 espécies de fungos associadas a infecções em seres humanos, incluindo mais de 100 gêneros de fungos filamentosos, 18 gêneros de leveduras e 6 gêneros de fungos dimórficos (Mills *et al.*, 2020). A origem destes fungos pode ser do ambiente ou, potencialmente, vir do microbioma ocular (Chakrabarti *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2020). Sequenciamento de próxima geração (NGS) está começando a permitir novos *insights* sobre o microbioma ocular fúngico tanto em condições saudáveis como em casos onde há uma infecção estabelecida. Em condições de saúde, até 94 gêneros fúngicos foram identificados na superfície ocular (Mills *et al.*, 2020). Um extenso número de espécies fúngicas foi relatado como agentes etiológicos de infecções oculares. Entre estas espécies, temos um raro patógeno humano, o *Sporothrix pallida*, membro do complexo *Sporothrix schenckii*, agentes causais de infecções subcutâneas. Logo, uma vez que espécies antes raras e descritas como agentes de infecções dermatológicas foram identificados como agentes oculares, a identificação precisa de agentes fúngicos em nível de espécie é uma questão de grande importância do ponto de vista clínico e epidemiológico (Mahmoudi *et al.*, 2018).

4.1.1.3.4. AGENTES ETIOLÓGICOS: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

4.1.1.3.4.1. GÊNERO *Fusarium*

As espécies de *Fusarium* são fungos saprófitas, amplamente difundidos, responsáveis por importantes doenças, tanto em plantas como em seres humanos e animais. Em humanos causam graves doenças principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Thomas, 2003a; Muhammed *et al.*, 2013; van Diepeningen *et al.*, 2015). Em indivíduos imunocompetentes podem causar sinusites, onicomicoses e ceratites, contudo, em imunocomprometidos, podem causar infecções mais graves, incluindo fusariose invasiva e disseminada (Dabas *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2020). Mais de 70 espécies foram isoladas de infecções humanas (Lockhart e Guarner, 2019). Embora existam inúmeras espécies causadoras de infecções em seres humanos, *Fusarium solani* é a mais frequente, seguida por *F. oxysporum* (Dabas *et al.*, 2015; Lockhart e Guarner, 2019). A FIGURA 3 apresenta uma infecção ocular por *F. solani*.

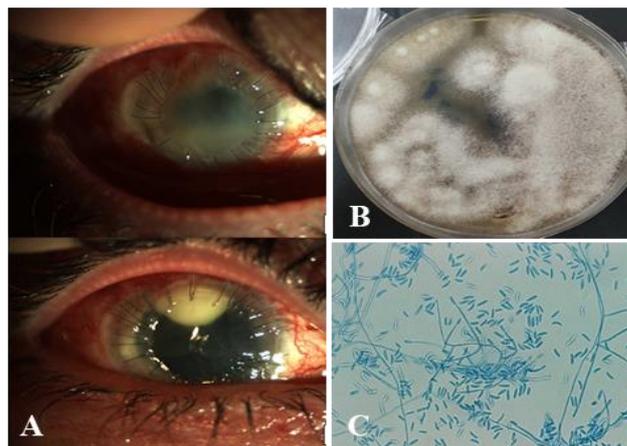


Figura 3. Infecção ocular por *Fusarium solani*: A) Apresentação clínica de endoftalmite; B) Macromorfologia da colônia; C) Micromorfologia: hifas e conídios (Adaptado de: Andrés *et al.*, 2018; Rajabzadeh *et al.*, 2020).

Sua importância como patógenos de infecções oculares é de longa data, particularmente em ceratites (Thomas, 2003a). O primeiro caso de doença humana relatado na literatura por espécies de *Fusarium* foi um caso de ceratite (Lockhart e Guarner, 2019). São capazes, especialmente *F. solani*, de destruir completamente um olho em algumas semanas. Esta infecção é geralmente grave e podem ocorrer perfuração, extensão profunda e glaucoma maligno. Na Índia,

um estudo detectou casos de ceratite severa em 53% dos casos de ceratite por espécies de *Fusarium* (Thomas, 2003a; Thomas, 2003b). Ceratites ocasionadas por fungos do gênero *Fusarium* encontram inúmeros impasses, que residem no diagnóstico tardio, tratamento específico atrasado, progressão fulminante e penetração da membrana de Descemet, disponibilidade restrita de terapias, penetração baixa dos agentes antifúngicos e resistência à terapia (Czakó *et al.*, 2019). *Fusarium* sp. pode ser altamente resistente a antifúngicos e o padrão de resistência varia de espécie para espécie, mesmo dentro de um complexo de espécies (Lockhart e Guarner, 2019). Em casos resistentes à terapia, a ceratoplastia penetrante precoce de grande diâmetro deve ser realizada, exigindo a remoção completa da área acometida pelo fungo (Czakó *et al.*, 2019). Embora causem uma forma severa e rapidamente progressiva de ceratite, pouco suscetível à terapia, alguns estudos revelaram que 23–32% das úlceras da córnea devido a espécies de *Fusarium* levam a ceratoplastia (Thomas, 2003b).

4.1.1.3.4.2. GÊNERO *Aspergillus*

Aspergillus spp. são encontrados de forma vasta no meio ambiente, com distribuição mundial, presente em inúmeros substratos, como o solo, água e vegetação em decomposição. São importantemente contaminantes comuns em hospitais, presentes, principalmente, no ar (Thomas, 2003a; Weber *et al.*, 2009; Jenks e Hoenigl, 2018). São responsáveis por uma gama de infecções em humanos, principalmente em indivíduos com algum comprometimento do sistema imunológico. Das espécies conhecidas por causar infecções em seres humanos, *Aspergillus fumigatus* é a mais comum (Weber *et al.*, 2009; Jenks e Hoenigl, 2018). A FIGURA 4 apresenta uma infecção ocular por *Aspergillus* spp.



Figura 4. Infecção ocular por *Aspergillus* spp.: A) Apresentação clínica de endoftalmite exógena; B) Macromorfologia da

colônia; C) Micromorfologia: conidióforos e conídios (Adaptado de: Gruener *et al.*, 2016; Acuña *et al.*, 2015).

Em um relato de surto de endoftalmite ocorrida após cirurgia de catarata, este gênero foi implicado e o rastreo levou para uma construção do hospital em andamento (Thomas, 2003a). Contudo, não estão restritos apenas a casos de endoftalmite, são implicados em outros tipos de infecções oftálmicas (Thomas, 2003a). Infecções invasivas por espécies de *Aspergillus* têm uma predileção marcada pela órbita e tecidos adjacentes, incluindo os seios paranasais. Apresentam diferentes apresentações de infecções oculares no mesmo hospedeiro, ainda que o indivíduo seja saudável, porém, são mais invasivos no hospedeiro imunocomprometido (Kalkanci e Ozdek, 2010). Acredita-se que as espécies de *Aspergillus* causem uma forma menos severa e não tão rapidamente progressiva de ceratite, na maioria dos casos suscetível à terapia. No entanto, alguns estudos revelaram que 42-60% das infecções da córnea por espécies de *Aspergillus* levam à ceratoplastia (Thomas, 2003b).

4.1.1.3.4.3. GÊNERO *Candida*

Espécies do gênero fúngico *Candida* fazem parte da microbiota do corpo humano, estão presentes na pele, membranas mucosas da boca, garganta, trato respiratório superior e gastrointestinal (Bujdáková, 2016). Contudo, podem tornar-se patogênicas e causar infecções oportunistas (Bujdáková, 2016; Silva *et al.*, 2017). Um grande número de casos de infecções oculares é devido a espécies de *Candida*. A ceratite causada por *C. albicans* e fungos relacionados assemelha-se à ceratite bacteriana, com um defeito epitelial sobrejacente, infiltrado discreto e progressão lenta (Thomas, 2003a; Thomas, 2003b). Infecções oculares por estas leveduras ocorrem, geralmente, na presença de doença sistêmica, ocular ou pacientes em terapia prolongada com corticosteróides (Thomas, 2003a). *Candida albicans* é a causa mais comum de candidíase ocular, podendo ser responsável por até 92% dos casos, conforme a região geográfica avaliada, seguido pela *Candida tropicalis*, a segunda causa mais comum. São mais comuns em endoftalmites endógenas, já casos exógenos por espécies de *Candida* são menos comuns e a maioria ocorre após cirurgia. Nestes casos, *Candida parapsilosis* é a

espécie mais comum, o motivo mais provável relaciona-se ao fato desta espécie sobreviver bem em fluidos de irrigação e em materiais protéticos (Durand, 2013). Nas infecções oftálmicas por espécies de *Candida*, significativo número de pacientes responde à terapia antifúngica sistêmica (Durand, 2013). A FIGURA 5 apresenta uma infecção ocular por *C. albicans*.

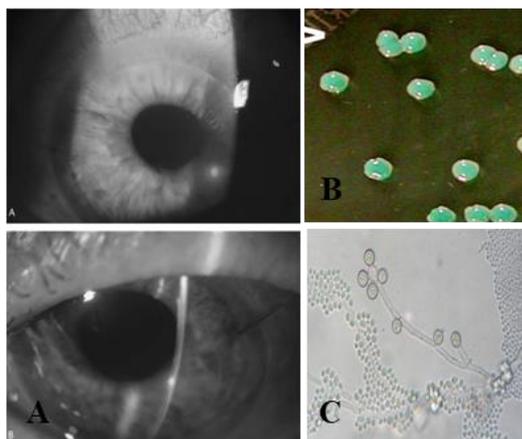


Figura 5. Infecção ocular por *Candida albicans*: A) Ceratite; B) Macromorfologia da colônia em CHROMagar Candida, apresentando colônias em um tom esverdeado; C) Micromorfologia: clamidósporos e bastoconídios (Adaptado de: Kitzmann *et al.*, 2009; Eraso *et al.*, 2006; Boscarol *et al.*, 2012).

4.1.1.3.4.4. FUNGOS DEMÁCEOS

Os fungos demáceos representam um grupo grande e de alta diversidade de fungos filamentosos, que possuem como característica comum a presença, na sua parede celular, de melanina e/ou pigmentos semelhantes à ela, responsáveis pela pigmentação marrom de hifas e conídios (Brandt e Warnock, 2003; Wong e Revankar, 2016). São microrganismos saprofíticos e fitopatogênicos, amplamente distribuídos no meio ambiente, sendo encontrados no solo, madeira e restos de plantas em decomposição (Brandt e Warnock, 2003). No entanto, vêm sendo reconhecidos como importantes causas de infecções em seres humanos. São capazes de acometer tanto indivíduos imunocomprometidos como aqueles imunocompetentes. Podem provocar diversos tipos de infecções, as feo-

hifomicoses, que variam de doenças cutâneas ou subcutâneas localizadas a doenças invasivas disseminadas, incluindo, casos de ceratite e endoftalmite. Ainda, dentro deste grupo encontram-se os agentes fúngicos responsáveis pela cromoblastomicose (Brandt e Warnock, 2003; Wong e Revankar, 2016). A FIGURA 6 apresenta uma infecção ocular por *Curvularia* spp.

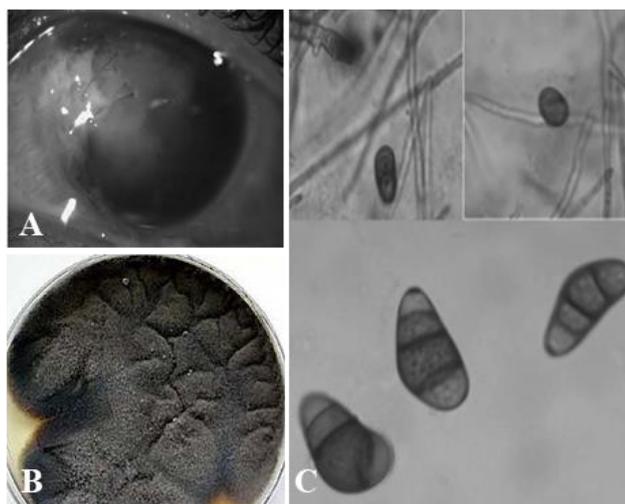


Figura 6. Infecção ocular por *Curvularia* spp.: A) Apresentação clínica da ceratite; B) Macromorfologia; C) Micromorfologia: conídios (Adaptado de: Jaramillo *et al.*, 2013).

Fungos demáceos (*Curvularia* spp., *Bipolaris* spp. ou *Exserohilum* spp.) foram relatados como a terceira causa mais frequente de ceratite fúngica e também podem causar infecções da órbita ou infecções intraoculares (Thomas, 2003a). Cerca de 20 espécies e 11 gêneros diferentes de fungos demáceos foram implicados como agentes de ceratite (Thomas, 2003a). Ceratites ocasionadas por estes fungos são caracterizadas por pigmentação marrom ou preta na superfície da úlcera, com aspecto seco, áspero e coriáceo, o que pode tornar difícil a obtenção de material de raspagem para cultura (Thomas, 2003a; Srinivasan, 2004). Quando não é realizada terapia adequada ou se houver o uso de corticosteroides, mesmo que tópico, pode ocorrer o agravamento da infecção, com envolvimento de camadas mais profundas da córnea, com extensão intraocular (Thomas, 2003a). Na ceratite por espécies de *Curvularia* infiltrações superficiais na forma de “penas” podem ser observadas, com progressão lenta e

supuração focal. Aplicação tópica de natamicina, na maioria dos casos, leva à resolução clínica (Thomas, 2003b). A cirurgia pode ser necessária quando há complicações no quadro, em casos onde há negligência da infecção ou quando há o uso de terapia com esteroides (Thomas, 2003b). *Lasiodiplodia theobromae* é um importante agente de fitopatogenicias. Inicialmente, foi relatado como causa de ceratite humana em dois pacientes na Índia e, posteriormente, relatórios do sul dos Estados Unidos Estados, outras partes da Índia, Sri Lanka e outros países confirmaram este fungo como patógeno em córneas humanas. Podem ser observadas hifas septadas no tecido infectado e causa ceratite severa, pouco responsiva à terapia (Thomas, 2003a).

4.1.1.3.4.5. OUTROS FUNGOS

Scedosporium apiospermum (*Pseudallescheria boydii*) pode ser isolado do ambiente (como solo, esterco de animais de fazenda) e foi relatado como agente de infecção ocular grave após trauma por material vegetal, cirurgia, contato com água poluída e imunossupressão (Thomas, 2003a; Thomas, 2003b). A ceratite ocasionada por este fungo se assemelha a outros tipos de ceratite fúngica e pode envolver toda a córnea (Thomas, 2003b). Embora se assemelhem a outros tipos de ceratite, podem não ter uma resposta satisfatória frente à terapia médica sozinha (Thomas, 2003a). *Scedosporium prolificans* foi relatado como causa de escleroceratite (Thomas, 2003a). Espécies de *Paecilomyces* são encontradas em todo o mundo como saprófitas no solo e vegetação em decomposição e são fontes comuns de contaminação, pois são resistentes à maioria dos procedimentos de esterilização comuns. Estas infecções oculares por *Paecilomyces* spp. estão associadas, especialmente, a procedimentos cirúrgicos (Thomas, 2003a). As espécies de *Acremonium* são generalizadas, ocorrendo no solo e no ar, e inúmeros casos de ceratite e ocasionais casos de endoftalmite já foram relatados (Thomas, 2003a).

As infecções oculares pelos zigomicetos incluem zigomicose rino-orbitocerebral e ceratite. A primeira é uma complicação devastadora da cetoacidose diabética e o uso de terapias imunossupressoras após transplante de

órgãos. Há uma predileção destes fungos pela órbita e tecidos adjacentes, incluindo os seios paranasais (Kalkanci e Ozdek, 2010). Espécies de *Rhizopus* spp. estão mais frequentemente envolvidas nestas infecções, mas outros gêneros da ordem *Mucorales* também podem causar doença ocular (Thomas, 2003a). Ceratite devido a um zigomiceto, especialmente *Rhizopus arrhizus* e *Absidia corymbifera*, ocorre muito raramente, no entanto, quando ocorre, é de forma fulminante e sem resposta à terapia médica (Thomas, 2003a).

Fungos dimórficos também já foram associados às infecções oftálmicas, como o *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo de solo e de vegetação em decomposição em regiões de infecção endêmica (sul México e América Central e do Sul). Geralmente o envolvimento ocular é encontrado em casos da reativação da doença, geralmente em indivíduos em atividades de agricultura em regiões endêmicas (Thomas, 2003a). *Coccidioides immitis* é encontrado em solos de regiões quentes e secas, onde a infecção é endêmica (sudoeste Estados Unidos, norte do México e áreas localizadas na região central e América do Sul). A doença pode ocasionar lesões oculares. *Blastomyces dermatitidis*, isolado de solos úmidos com alto conteúdo orgânico. Podem ocasionar infecções oculares, incluindo lesões da pálpebra, doença orbital, ceratite e endoftalmite (Thomas, 2003a). A histoplasmose é classicamente causada por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, foi implicado na "síndrome da histoplasmose ocular presumida" e em várias outras infecções oftálmicas, principalmente intraoculares, já o patógeno *H. capsulatum* var. *duboisii* foi relatado como causador de doença orbitária (Thomas, 2003a).

Espécies de *Cryptococcus* também podem causar infecções oculares (Thomas, 2003a). Além disso, diversos outros fungos foram relatados como agentes de algum tipo de infecção oftálmica, com diferentes níveis de gravidade. *Sporothrix schenckii* que é encontrado em solo e material vegetal em decomposição, com distribuição mundial, é geralmente causador de lesões nodulares nos tecidos cutâneos e subcutâneos. No entanto, foi relatado como causador de lesões na órbita, esclera e estruturas intraoculares (Thomas, 2003a). *Pneumocystis carinii* foi implicado como causa de coroidite e infecção orbital em

pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês AIDS) (Thomas, 2003a). Diante da diversidade fúngica relacionada à infecções oculares, o diagnóstico se mostra de grande importância para o direcionamento do tratamento adequado para um desfecho positivo para o paciente (Thomas, 2003b; Mills *et al.*, 2020).

4.1.1.3.5. DIAGNÓSTICO

O desfecho relacionado às infecções fúngicas associa-se ao seu pronto reconhecimento, uma vez que a rápida detecção favorece uma recuperação completa (Thomas, 2003b). Um número grande de gêneros e espécies fúngicas tem sido implicados como responsáveis por infecções oftálmicas, ainda, há um crescente constante nesse número (Thomas, 2003a). Para o diagnóstico e tratamento da ceratite fúngica é muito importante conhecer as diferenças na prevalência geográfica e suscetibilidade dos patógenos fúngicos (Mills *et al.*, 2020).

A apresentação e as características clínicas são importantes, uma vez que podem auxiliar o diagnóstico de ceratite fúngica em si (Thomas e Kaliamurthy, 2013). No entanto, os sintomas são geralmente inespecíficos, ainda que prolongados em relação às infecções bacterianas (Thomas, 2003b). Estruturas fúngicas em exame microscópico direto e isolamento de agente fúngico em cultura de raspagem da córnea ou material de biópsia, do vítreo e/ou aquoso ou por hemoculturas em alguns casos endógenos, representam o padrão de diagnóstico laboratorial. No entanto, a cultura demanda tempo, sendo um procedimento demorado (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Durand, 2017; Mahmoudi *et al.*, 2018). Logo, outras abordagens com resultados mais rápidos, como técnicas de imagem *in vivo*, como microscopia confocal que produz imagens em tempo real do tecido da córnea e tomografia de coerência óptica do segmento anterior do globo ocular, e técnicas moleculares, mostram-se importantes no intuito de facilitar o diagnóstico (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2018). A Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) ganhou destaque no auxílio diagnóstico, complementando

métodos microbiológicos, é um teste que permite rápida e específica identificação do agente etiológico, inclusive em casos de cultura negativa (Thomas e Kalamurthy, 2013; Durand, 2017).

Os resultados clínicos de ceratite fúngica são piores do que ceratite bacteriana devido ao diagnóstico, que geralmente é tardio, além do uso inadequado de antibacterianos e/ou esteroides, bem como uma escolha limitada de medicamentos antifúngicos clinicamente aprovados (Mills *et al.*, 2020). Diante disso, ainda temos o fato de que diferentes gêneros e espécies de fungos variam em seu perfil de suscetibilidade aos antifúngicos. Assim, o teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro* pode auxiliar na escolha da terapia antifúngica mais adequada (Mahmoudi *et al.*, 2018). No entanto, a ausência de testes padronizados, devido ao tamanho amostral que geralmente é muito pequeno e/ou diferentes metodologias de suscetibilidade *in vitro* utilizadas, ocasionando não uniformidade dos dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019). Ainda, o foco, na maioria dos estudos, é voltado para uma espécie particular e os pontos de corte para a interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade são específicos da espécie (Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019). Logo, para otimizar e melhorar as taxas de sucesso da terapia antifúngica ocular é necessário o desenvolvimento de modelos robustos de correlação *in vitro/in vivo*. Estes modelos de suscetibilidade *in vitro* precisam ser sensíveis, específicos, confiáveis, reproduzíveis e padronizados, para evitar falhas no tratamento e recidivas com a farmacoterapia ocular disponível atualmente (Lakhani *et al.*, 2019). Entre as principais preocupações no manejo das infecções fúngicas oculares está a escassez de ferramentas de diagnóstico laboratorial e determinação da sensibilidade ao fármaco (Sahay *et al.*, 2019). Diagnóstico e tratamento imediatos são essenciais para salvar a visão do indivíduo (Durand, 2017).

4.1.1.3.6. TERAPIA: FARMACOLÓGICA E NÃO FARMACOLÓGICA

No manejo de infecções fúngicas oculares, entre as principais preocupações, além da falta de disponibilidade de ferramentas de diagnóstico laboratorial, também há a gestão restrita, devido à escassa disponibilidade de agentes antifúngicos eficazes (Thomas, 2003b; Sahay *et al.*, 2019). Até dois terços dos pacientes podem perder a visão, portanto, devem ser tratados imediatamente para prevenir tais consequências (Durand, 2013; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). A morbidade ocular ocasionada pelas infecções fúngicas oculares é resultante da relação entre os patógenos fúngicos invasores e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Mesmo os fungos de uma mesma espécie, podem ter diferentes padrões de virulência. Além disso, temos diferentes respostas de defesa do hospedeiro e do microbioma ocular adjacente (Mills *et al.*, 2020). O manejo desta condição (particularmente se ocorrerem lesões profundas) é problemático (Thomas e Kaliamurthy, 2013). A escolha da terapia antifúngica para o tratamento destas infecções deve ser racional, baseada na determinação do padrão de suscetibilidade do fungo isolado (Thomas e Kaliamurthy, 2013). Ainda, na determinação de um regime antifúngico apropriado, é essencial avaliar alguns aspectos do agente antifúngico proposto dentro do quadro clínico que é apresentado: capacidade de penetrar nos tecidos oculares, espectro de atividade e perfil de toxicidade (Patil e Majumdar, 2017).

A gravidade e a localização das infecções fúngicas oculares ditam a via de administração do medicamento (Lakhani *et al.*, 2019; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). No contexto atual, a terapia convencional para casos de ceratite fúngica ou demais infecções da região anterior da câmara, em sua maioria, são tratadas pela administração de fármacos por via tópica (Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Considerando os benefícios das formas tópicas, como alta adesão do paciente, facilidade de uso, não invasividade, indolor, efeitos colaterais reduzidos e tratamento seletivo da câmara anterior, a via tópica é a preferida para a administração de medicamentos no tratamento destas infecções oftálmicas (Lakhani *et al.*, 2019; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Infelizmente, as formas farmacêuticas tópicas enfrentam alguns desafios, como baixa penetração do fármaco nas diferentes camadas do olho, compostos com

uma massa molecular > 500 daltons (Da) quase não penetram o epitélio corneano intacto. Além disso, alta frequência de administração, baixo tempo de residência e toxicidade causada pelo uso de longo prazo também são desafios importantes (Kaur e Kakkar, 2010; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Até o momento, entretanto, não há nenhum novo sistema de aplicação de antifúngico ocular tópico aprovado pela FDA disponível (Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Dentre as estratégias ocasionalmente utilizadas no tratamento de ceratite fúngica, há o uso de lentes de contato contendo um ativo cuja liberação ocorre de forma gradual na superfície ocular (Sahay *et al.*, 2019).

Casos de infecções fúngicas oculares mais profundas são necessárias outras vias além da tópica, como as vias parenterais ou intraoculares, como as vias intraestromal e intracameral, utilizadas em casos de ceratite fúngica profunda e recalcitrante (Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). O tratamento sistêmico ou oral com antifúngicos é usado em casos com envolvimento escleral ou límbico, endoftalmite, perfuração iminente ou úlcera de córnea perfurada, casos pediátricos, casos recalcitrantes e casos de pacientes pós-ceratoplastia (Sahay *et al.*, 2019). A utilização de antifúngicos orais em casos de infecções fúngicas oculares refratárias tem sido adotada, com algum sucesso. Rotineiramente, não são recomendados como tratamento único, com base nas evidências atualmente disponíveis (Sahay *et al.*, 2019). Já as vias intraestromal e intracameral para liberação de antifúngicos são utilizadas em casos de ceratite fúngica profunda e recalcitrante (Sahay *et al.*, 2019).

A escolha mais adequada para o tratamento de micoses oftálmicas tem o objetivo final de preservar a visão, e isso depende de um diagnóstico rápido e eficiente administração de terapia antifúngica apropriada (Thomas, 2003a). Atualmente, a terapia de doenças fúngicas do olho é insatisfatória (Srinivasan, 2004). Com exceção da natamicina, antifúngicos polienos e azóis, como anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol, voriconazol e posaconazol são rotineiramente usados *off-label* no ambiente clínico (Lakhani *et al.*, 2019).

Os antifúngicos polienos e azóis são conhecidos por exibir toxicidades oculares e sistêmicas, que se manifestam como um dos principais desafios associados ao seu uso terapêutico (Lakhani *et al.*, 2019). Essas classes de antifúngicos vêm ocupar um nicho importante na terapia antifúngica oftálmica devido ao seu amplo espectro de atividade, frente uma variedade de fungos filamentosos e leveduriformes (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019). Assim, eles têm sido usados como agentes terapêuticos de primeira linha para tratar infecções fúngicas oculares, tendo sua aplicação tópica como abordagem primária (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019). No entanto, seu uso na terapia antifúngica ocular tem sido um desafio devido às suas propriedades físico-químicas e à anatomia e fisiologia ocular, uma vez que, em muitos casos, exibem baixa penetração pela córnea, limitando sua utilidade em casos de infecções mais profundas (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019).

Atualmente, a suspensão de natamicina (também conhecido como pimaricina) 5% é a única formulação de uso tópico aprovada pelo FDA para o tratamento de infecções fúngicas oftálmicas (Kaur e Kakkar, 2010; Czakó *et al.*, 2019; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Introduzida em 1960, não houve nenhum novo tratamento aprovado pela FDA para esta condição desde então (Mills *et al.*, 2020). Embora seja encontrada como formulação comercial em alguns países, no Brasil a sua formulação tópica ocular necessita ser manipulada (Müller *et al.*, 2013). A natamicina é um fármaco eficaz no tratamento de infecção na córnea por espécies fúngicas, ceratite fúngica, conjuntivite e blefarite, é a primeira linha eficaz de tratamento (Patil e Majumdar, 2017; Mahmoudi *et al.*, 2018).

A natamicina, devido ao tamanho do seu anel macrolídeo, diferente da anfotericina B, não forma poros transmembrana (Kristanc *et al.*, 2018). Embora o mecanismo exato pelo qual este fármaco atua na célula fúngica não esteja totalmente descrito, acredita-se que sua ação ocorra através da ligação direta ao ergosterol, bloqueando suas atividades funcionais na célula (Welscher *et al.*, 2008). Tem um amplo espectro de atividade, mas limitada aos fungos filamentosos, espécies de *Fusarium e Aspergillus*, *Acremonium*, *Alternaria*,

Cephalosporium, Colletotrichum, Curvularia, Lasiodiplodia, Scedosporium, Trichophyton e Penicillium spp.. Contudo, apenas uma atividade de moderada a fraca contra os fungos leveduriformes (espécies de *Candida*) (Kaur e Kakkar, 2010; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Essa atividade seletiva levou ao uso da natamicina como medicamento de primeira linha no tratamento da ceratite fúngica ocular superficial causada por espécies de fungos filamentosos (Thomas, 2003a; Lakhani *et al.*, 2019). Sua atividade antifúngica está relacionada à dose usada clinicamente, na qual é principalmente fungicida (Sahay *et al.*, 2019).

A natamicina é pouco solúvel em água, é estável em suspensão, nessa forma possui boa aderência à córnea por períodos clinicamente úteis, útil no tratamento de infecções superficiais (Thomas, 2003 A; Kaur e Kakkar, 2010). A suspensão oftálmica tópica a 5%, embora viscosa, possui melhor tolerabilidade ocular em comparação com os outros antifúngicos e não causa dor ou dano secundário da córnea (Kaur e Kakkar, 2010; Patil e Majumdar, 2017). Há penetração insatisfatória no estroma corneano e na conjuntiva após a aplicação tópica, devido ao seu alto peso molecular, assim, baixa biodisponibilidade, apenas 2%, necessitando de administrações frequentes (Thomas, 2003 A; Kaur e Kakkar, 2010; Patil e Majumdar, 2017; Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019). Geralmente, essa administração garante uma concentração suficiente do antifúngico dentro do estroma corneano, mas não no aquoso, bem como não há absorção sistêmica. Assim, o debridamento epitelial da córnea pode ser uma opção para aumentar sua penetração (Sahay *et al.*, 2019). Só pode ser administrada topicamente, uma vez que a administração intravenosa e subconjuntival não leva a concentrações terapêuticas no humor aquoso e vítreo. Assim, é útil apenas no tratamento da infecção superficial e não encontra aplicação na ceratomicose profunda (Kaur e Kakkar, 2010; Patil e Majumdar, 2017). Da mesma forma, também não pode ser administrada por via intracamerar (Czakó *et al.*, 2019). Tem sido usada em associação com outras formas de tratamento para terapia de esclerite, conjuntivite e endoftalmite fúngicas (Thomas 2003b; Kaur e Kakkar, 2010).

O uso prolongado de natamicina pode estar associado com alguns sintomas locais de desconforto, como leve irritação, vermelhidão, sensação de corpo estranho, ardência, sensação de queimação e lacrimejamento. A aderência das partículas da suspensão de natamicina à área de ulceração epitelial, bem como nos fórnices e margens palpebrais é um problema comum (Sahay *et al.*, 2019).

Anfotericina B é um antifúngico variavelmente fungistático e ocasionalmente fungicida, dependendo da concentração alcançada no tecido e a suscetibilidade do patógeno (Thomas, 2003a; Sahay *et al.*, 2019). Anfotericina B apresenta afinidade de ligação ao ergosterol da célula fúngica, dentre os inúmeros efeitos associados, o fármaco causa hiperpermeabilidade e lise celular através da ligação irreversível ao ergosterol da membrana celular do fungo com consequente formação de poros transmembrana (Kristanc *et al.*, 2018). Possui amplo espectro de atividade, ativo contra a maioria dos fungos, com potente atividade antifúngica contra espécies de *Candida* e *Aspergillus*, porém atividade de moderada a fraca contra espécies de *Fusarium* e *Scedosporium* (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Dessa forma, é o fármaco de escolha para leveduras, com uso frequente como um agente antifúngico *off-label* no tratamento de casos de ceratite grave por espécies de *Candida*, mas não em casos de ceratite por espécies de *Fusarium* (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Penetra mal nos tecidos oculares, por isso tem sido usada por via intravenosa para tratar infecções invasivas orbitárias e intraoculares. Assim como no tratamento de endoftalmite devido a fungos dimórficos e lesões das pálpebras, conjuntiva e córnea, sendo o antifúngico de primeira escolha para o tratamento de endoftalmite fúngica endógena (Armstrong, 2000; Kalkanci e Ozdek, 2010; Kaur e Kakkar, 2010).

A anfotericina B pode ser administrada por vias intravenosa, tópica (0,15-0,3%; 0,5%; 2%), intravítrea e intracameral para terapia de micoses oftálmicas. A aplicação subconjuntival não é mais recomendada devido à toxicidade grave (Kalkanci e Ozdek, 2010; Thomas e Kaliamurthy, 2013; Patil e Majumdar, 2017). A eficácia na ceratite fúngica, através da via tópica *off-label*

depende da integridade da córnea, sendo reduzida na presença de um epitélio corneano intacto (Kalkanci e Ozdek, 2010; Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019). Isso ocorre devido ao seu alto peso molecular e baixa solubilidade aquosa, que acarretam em maior dificuldade de penetração através da córnea e da barreira hematorretiniana (Lakhani *et al.*, 2019). Solução de 0,15% de anfotericina B em água estéril usada na prática clínica parece ser bem tolerada. A aplicação tópica de 0,5% pomada pode causar alguma irritação conjuntival, embora uma pomada a 2% tenha sido relatada como bem tolerada (Thomas, 2003a; Kalkanci e Ozdek, 2010). Formulações usadas topicamente para tratar conjuntivite, esclerite e ceratite (Kalkanci e Ozdek, 2010). A administração de anfotericina B por um escudo de colágeno pode melhorar conformidade e garante uma taxa mais constante de entrega de medicamentos na ceratite micótica. No entanto, pode dificultar para o clínico realizar exames clínicos frequentes no olho afetado, além disso, o uso impróprio também pode levar ao aumento toxicidade (Thomas, 2003a).

Injeções intravítreas de anfotericina B têm sido recomendadas para o tratamento de endoftalmite fúngica. Contudo, esta via pode ocasionar efeitos altamente destrutivos, levando à necrose retinal e descolamento se a injeção não é feita de maneira cautelosa, lentamente no centro do vítreo, o mais longe possível da retina (Thomas, 2003a). Administração intracameral pode ser considerada no tratamento de úlceras fúngicas profundas de córnea, com envolvimento estromal profundo, associado à câmara anterior com grave reação, ou casos resistentes, com toxicidade mínima sendo relatada (Mahmoudi *et al.*, 2018; Sahay *et al.*, 2019). A administração intraestromal leva a concentrações mais elevadas do fármaco no estroma corneano e, portanto, a um tempo de cicatrização menor (Czakó *et al.*, 2019).

O uso ocular de anfotericina B está associado a diversos efeitos colaterais, dificultando seu uso (Kalkanci e Ozdek, 2010; Patil e Majumdar, 2017). Juntamente com seu agente solubilizante podem ser tóxicos para os olhos (Armstrong, 2000; Kaur e Kakkar, 2010). Anfotericina B sistêmica tem toxicidade significativa e raramente é usada para tratar endoftalmite fúngica

exógena (Durand, 2013). As complicações principais associadas são catarata, hifema, irite e edema da córnea. Efeitos parcialmente associados a inibição de células T supressoras e ativação de várias células pró-inflamatórias (Sahay *et al.*, 2019). As injeções intraoculares (concentração acima de 1% p/v) estão associadas a efeitos adversos, como toxicidade retinal, perda de células ganglionares da retina, inflamação vítrea, edema da córnea, neovascularização e inflamação da córnea (Patil e Majumdar, 2017).

No uso intravenoso com direcionamento ao olho, a anfotericina B deve ser administrada em concentrações mais altas para que penetre na barreira hematorretiniana, o que pode levar à nefrotoxicidade dependente da dose. Estima-se que a toxicidade renal ocorra em quase 80% dos pacientes (Thomas, 2003a; Patil e Majumdar, 2017). Embora o uso de formulações de anfotericina B à base de lipídios (AMB-complexo lipídico e lipossomal) tenha proporcionado alternativas com maior segurança e redução da toxicidade renal (10 vezes a 20 vezes) (Kaur e Kakkar, 2010; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Dores de cabeça, calafrios, febre e anorexia são comuns, outros efeitos colaterais adversos incluem anemia moderada, náuseas, vômitos, cólicas gastrointestinais e diarreia, e tromboflebite local no local da infusão (Thomas, 2003a). Assim há limitação do uso da anfotericina B sistêmica na terapêutica ocular, reservado para pacientes em quem um diagnóstico de infecção fúngica seja bem fundamentado (Thomas, 2003a; Patil e Majumdar, 2017). Como não há metabolização pelas enzimas do citocromo P450, possui poucas interações medicamentosas (Sahay *et al.*, 2019). Anfotericina B é o antifúngico mais seguro para uso durante a gravidez, rotulado como um medicamento de categoria B pelo FDA (Sahay *et al.*, 2019).

Os azóis, como tiabendazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, cetoconazol, fluconazol, voriconazol e econazol, são opções terapêuticas para infecções oculares (Armstrong, 2000). Os azóis atuam na membrana celular fúngica, inibindo a enzima responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, a 14- α -lanosterol desmetilase. O ergosterol é um componente importante da membrana celular dos fungos e, portanto, essencial para o crescimento destes microrganismos (Thompson e Lewis, 2009). Todos os azóis,

exceto fluconazol, parecem diminuir a função das células do sistema imunológico, especialmente linfócitos; isso pode diminuir o grau de dano ao tecido ocorrido com a reação inflamatória, mas também afeta a eficácia dos azóis *in vivo* (Thomas, 2003a).

O fluconazol é considerado ativo contra as espécies *Candida* (exceto *Candida krusei* e *C. glabrata* pode ter baixa suscetibilidade) e *Aspergillus*, com resistência por outros fungos filamentosos, como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. e Mucorales, um espectro estreito em comparação com outros triazóis (Patil e Majumdar, 2017; Sahay *et al.*, 2019). Assim, é um candidato adequado no tratamento de ceratite profunda por *Candida* spp., mas não pode ser considerado o agente de escolha no tratamento da ceratite por fungos filamentosos (Thomas, 2003b; Lakhani *et al.*, 2019).

O fluconazol é um antifúngico estável e solúvel em água com baixa massa molecular e alta biodisponibilidade, podendo ser útil como agente ocular (Kaur e Kakkar, 2010). Penetra as barreiras oculares, tanto na administração tópica *off-label* (1%), oral e sistêmica, e tem mostrado uma resposta terapêutica em ceratite fúngica. Indicado até em infecções fúngicas oculares profundas (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019). As formas farmacêuticas orais disponíveis incluem comprimidos e pó para suspensão (Sahay *et al.*, 2019). O fluconazol alcança altos níveis de penetração nos tecidos oculares horas após uma única dose, sua biodisponibilidade oral é cerca de 90%, com baixa capacidade de ligação as proteínas plasmáticas (10%-20%) e baixa lipofilicidade, chegando a uma concentração no humor aquoso de 64% da concentração plasmática (Armstrong, 2000; Sahay *et al.*, 2019). A injeção subconjuntival do fluconazol (0,5-1,0 mL de solução 2%) já foi investigada (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Sahay *et al.*, 2019).

O fluconazol é considerado um agente antifúngico econômico e seguro, com perfil de baixa toxicidade entre os antifúngicos azóis (Lakhani *et al.*, 2019). No entanto, o uso de fluconazol tem seus próprios desafios, que é o rápido desenvolvimento de resistência e resistência cruzada às espécies de fungos na

exposição prolongada ou devido ao descumprimento do tratamento pelo paciente (regime terapêutico incompleto) (Patil e Majumdar, 2017). Os efeitos adversos sistêmicos comuns incluem gastrite, dor de cabeça e erupções cutâneas. Em alguns casos, trombocitopenia, síndrome de Stevens-Johnson e hepatotoxicidade podem ocorrer. Rotulado como um medicamento da categoria D pelo FDA para uso durante gravidez e, portanto, não deve ser usado (Sahay *et al.*, 2019).

O voriconazol apresenta um espectro mais amplo de atividade em comparação com os outros antifúngicos azólicos. Demonstra uma potente ação biológica contra espécies de *Candida* e *Aspergillus* (mesmo aquelas conhecidas por serem resistentes à anfotericina B e ao fluconazol e itraconazol), *Scedosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Cryptococcus* spp. e patógenos fúngicos dimórficos. No entanto, a atividade contra os Mucorales é mínima (Srinivasan, 2004; Thomas e Kalliamurthy, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2018; Sahay *et al.*, 2019).

O voriconazol demonstrou eficácia terapêutica em ceratite fúngica e endoftalmite após administração intraestromal, intracameral, intravítrea, oral e tópica (Thomas e Kalliamurthy, 2013; Patil e Majumdar, 2017; Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019). Encontra-se disponível em formulações orais e parenterais, seu uso oftálmico na forma tópica é *off-label* e requer reconstituição da formulação parenteral disponível a uma solução 1-2% (Thomas e Kalliamurthy, 2013; Sahay *et al.*, 2019). O voriconazol é o azol preferido a ser utilizado por via tópica no tratamento de infecções fúngicas oculares (Patil e Majumdar, 2017; Mahmoudi *et al.*, 2018). Voriconazol tópico possui alta penetração intraocular e é bem tolerado pelo tecido ocular (Thomas e Kalliamurthy, 2013). Embora pela via tópica atinja uma concentração no humor aquoso que está acima da CIM, pode ocorrer uma alta variação na concentração do fármaco no local e podem ser encontradas concentrações inferiores à CIM necessária para tratar a infecção (Mahmoudi *et al.*, 2018; Sahay *et al.*, 2019).

Geralmente, o voriconazol é administrado por via oral para o tratamento da ceratite por conta da maior conformidade para o paciente, biodisponibilidade oral alta (aproximadamente 90%), boa penetração e biodisponibilidade nos

tecidos oculares (Mahmoudi *et al.*, 2018; Sahay *et al.*, 2019). A administração oral de voriconazol pode ser um tratamento eficaz para casos selecionados de ceratite fúngica, com concentração de antifúngico intraocular bem acima da CIM necessária para a maioria dos patógenos fúngicos da córnea (Mahmoudi *et al.*, 2018).

A administração intracamerar de voriconazol (50 µg/0,1 mL) foi relatada como eficaz em casos de úlceras de córnea fúngicas profundas e recalcitrantes (Thomas e Kaliyamurthy, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2018; Sahay *et al.*, 2019). A vantagem sobre a aplicação de anfotericina B é seu amplo espectro de atividade, pois apresenta complicações semelhantes. Contudo, as limitações se encontram no fato de representar disseminação da infecção, inflamação intraocular, dano lenticular, glaucoma, hifema e dano endotelial potencial. Embora essas complicações raramente tenham sido relatadas, o risco de tais eventos deve ser conhecido na escolha desses procedimentos (Sahay *et al.*, 2019). Mais estudos robustos são necessários para a determinação de seu benefício no manejo da ceratite fúngica (Mahmoudi *et al.*, 2018).

A administração intraestromal leva a concentrações mais elevadas do fármaco no estroma corneano, fornece um depósito do fármaco, próximo à área ulcerada, de onde o antifúngico é lentamente liberado no tecido infectado, de maneira a envolver o tecido infectado (Czakó *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). Leva a um tempo de cicatrização mais curto (Czakó *et al.*, 2019). É uma abordagem eficaz para infecções fúngicas profundas da córnea recalcitrantes, que não respondem a modalidades de tratamento convencional (Sahay *et al.*, 2019). Relatos de sucesso no uso da gestão da ceratite recalcitrante por *Acremonium* e *Alternaria*, podendo apresentar taxa de cura acima de 70% (Sahay *et al.*, 2019).

Clinicamente importante, o voriconazol, embora tenha amplo e potente espectro de atividade antifúngica, está associado a consideráveis efeitos colaterais e adversos dependentes da concentração (Lakhani *et al.*, 2019). Os efeitos adversos associados ao seu uso por via oral incluem distúrbios visuais, mudanças na visão de cores e fotofobia. Raramente, alucinações visuais

transitórias ou confusão podem ocorrer. Erupções cutâneas, hepatotoxicidade, alterações eletrocardiográficas e toxicidade óssea associada a flúor também podem ser observadas. O uso tópico pode causar dermatite de contato periocular. É um antifúngico rotulado na categoria D pelo FDA e é contraindicado durante a gravidez, pois é teratogênico e resulta em anormalidades esqueléticas e viscerais (Sahay *et al.*, 2019).

Cetoconazol foi o primeiro antifúngico azol de amplo espectro por via oral e sua absorção é fortemente dependente do pH gástrico, requer um meio ácido para dissolução e absorção (Thomas, 2003a; Sahay *et al.*, 2019). Demonstrou atividade antifúngica após administração oral, tópica e subconjuntival, limitada a alguns fungos filamentosos, leveduriformes (incluindo *Candida* spp.), fungos dimórficos e dermatófitos (Patil e Majumdar, 2017; Sahay *et al.*, 2019).

O uso deste antifúngico por via tópica e sistêmica é recomendado para o tratamento de ceratite fúngica (Kaur e Kakkar, 2010). A administração tópica mostrou penetração apenas quando o epitélio da córnea foi raspado, uma vez que possui penetração pobre através da córnea e das barreiras hematoculares. Isso ocorre devido ao seu alto peso molecular, caráter hidrofóbico e sua capacidade de ligação às proteínas (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019; Sahay *et al.*, 2019). No entanto, o tratamento das infecções oftálmicas, normalmente, requer concentração de antifúngico na córnea e no humor aquoso, sendo necessário um veículo para administrar este antifúngico em uma solução aquosa de colírio (Kaur e Kakkar, 2010). Assim, é muitas vezes usado apenas como um adjuvante na terapêutica antifúngica ocular (Patil e Majumdar, 2017). Altas concentrações de cetoconazol foram alcançadas na córnea e câmara anterior por administração via oral, assim é recomendado para infecções fúngicas oculares profundas (Patil e Majumdar, 2017).

O uso de cetoconazol tópico não é associado à toxicidade corneana significativa e é geralmente bem tolerado (Patil e Majumdar, 2017). A administração oral de cetoconazol pode levar a vários efeitos colaterais

reversíveis, uma vez que regimes terapêuticos prolongados podem ser necessários, o uso do cetoconazol oral tem sido limitado (Thomas, 2003a; Patil e Majumdar, 2017). O principal efeito adverso do seu uso por via oral é a hepatotoxicidade, mas também pode ser relatado ginecomastia, hiperglicemia, alterações menstruais, hipertensão, diminuição da libido, oligospermia, anafilaxia, insuficiência adrenal, anorexia, hiperlipidemia, aumento do apetite, insônia, nervosismo, dor de cabeça, tontura, parestesia, sonolência, toxicidade fotoquímica e hipotensão ortostática (Patil e Majumdar, 2017; Sahay *et al.*, 2019). Outros efeitos adversos incluem distúrbios gastrointestinais como vômitos, diarreia, náuseas, prisão de ventre, abdominais dor, boca seca, disgeusia, dispepsia, flatulência, língua descoloração, hepatite e icterícia. Pele e subcutâneo distúrbios teciduais incluem eritema multiforme, erupção cutânea, dermatite, eritema, urticária, prurido, alopecia, xeroderma, mal-estar, edema periférico, pirexia, calafrios e diminuição da contagem das plaquetas (Patil e Majumdar, 2017; Sahay *et al.*, 2019). Demonstrou ser teratogênico em estudos animais em altas doses e foi rotulado como medicamento da categoria C para uso na gravidez pelo FDA (Sahay *et al.*, 2019).

O itraconazol demonstrou ser ativo contra a maioria das espécies de *Candida*, várias espécies de *Aspergillus* e tem atividade mínima ou insignificante contra espécies de *Fusarium* e Mucorales (Patil e Majumdar, 2017; Sahay *et al.*, 2019). Contudo, está fortemente associado ao surgimento de resistência e resistência cruzada (Patil e Majumdar, 2017).

Itraconazol encontra-se disponível em formulações de uso sistêmico, oral (cápsulas e solução oral) e tópico (pomadas e soluções oftalmológicas a 1%), estas formulações não estão disponíveis universalmente (Thomas e Kalliamurthy, 2013; Sahay *et al.*, 2019). Administração tópica possui baixa penetração, devido ao peso molecular, ligação às proteínas no filme lacrimal-lipídico e a alta hidrofobicidade (Lakhani *et al.*, 2019). Este antifúngico é bem absorvido após administração oral, mas a absorção gástrica depende de um pH baixo. É muito hidrofóbico, assim, altamente concentrado em tecido rico em lipídios e pouco solúvel em solução aquosa, possui 90-99% de ligação às proteínas plasmáticas

(Thomas, 2003a; Sahay *et al.*, 2019). O itraconazol é geralmente bem tolerado após administração oral, mas a principal desvantagem do uso por esta via para a terapia de infecções fúngicas oculares é a sua baixa disponibilidade em tecidos oculares, córnea, humor aquoso e vítreo (Kaur e Kakkar, 2010; Durand, 2013; Patil e Majumdar, 2017). Portanto, geralmente não é recomendado para o tratamento de infecções oculares, devido à falta de eficácia clínica consistente (Patil e Majumdar, 2017; Sahay *et al.*, 2019). Mesmo que as injeções intravítreas e subconjuntivais exibam atividade terapêutica, alguns estudos relataram a ocorrência de necrose retinal (Patil e Majumdar, 2017). Devido à disponibilidade de dados escassos a este respeito, a administração intravítrea e subconjuntival não foi clinicamente adotada (Patil e Majumdar, 2017). O itraconazol é apenas usado como um adjuvante sistêmico para uma terapia antifúngica tópica ou intraocular (Patil e Majumdar, 2017).

Itraconazol é geralmente bem tolerado após administração oral, as queixas mais comuns são distúrbios gastrointestinais, erupção cutânea e dor de cabeça, com menos frequência são observados hipertrigliceridemia, hipocalcemia, edema, diminuição da libido e ginecomastia (Patil e Majumdar, 2017; Sahay *et al.*, 2019). Hepatotoxicidade e insuficiência hepática também estão entre os efeitos adversos mais comuns e são graves. Foi rotulado na categoria C pelo FDA para uso em gestantes, pois é teratogênico (Sahay *et al.*, 2019).

Posaconazol é um triazol recente com atividade de amplo e potente espectro contra a maioria das espécies de *Candida* (mesmo os isolados resistentes a fluconazol), *Fusarium*, *Aspergillus* e Mucorales (Sahay *et al.*, 2019; Mills *et al.*, 2020). Posaconazol tem sido usado com sucesso para tratar ceratite fúngica, em monoterapia oral ou em combinação com formulação tópica de outros antifúngicos, principalmente, no tratamento de ceratite recalcitrante por *Fusarium* e ceratites recalcitrantes a antifúngicos comuns (cetoconazol, fluconazol e voriconazol) (Sahay *et al.*, 2019; Mills *et al.*, 2020). Disponível na forma de suspensão oral, comprimido de liberação retardada, solução intravenosa e tem seu uso tópico *off-label*. Altamente ligado a proteínas (98%), pobre penetração em compartimentos oculares (Sahay *et al.*, 2019).

Os efeitos adversos comuns observados com o uso de posaconazol incluem febre, diarreia, náusea, vômito e dor de cabeça. Ainda, podem ser observados hipocalcemia, erupção cutânea, trombocitopenia, dor abdominal, níveis elevados de enzimas hepáticas e danos hepatocelulares. Boa tolerabilidade em longo prazo. Classificado na categoria C pelo FDA para uso durante a gravidez, pois é teratogênico (Sahay *et al.*, 2019).

O miconazol mostra atividade variável contra espécies de fungos filamentosos, potente atividade frente espécies de *Aspergillus* porém uma atividade fraca contra as espécies de *Fusarium* (Lakhani *et al.*, 2019). Miconazol parece ser importante no tratamento de ceratite por *Scedosporium apiospermum* (Thomas e Kaliyamurthy, 2013). A solução de miconazol pode ser usada para administração tópica ocular (1%) *off-label* ou para administração subconjuntival (Kaur e Kakkar, 2010; Thomas e Kaliyamurthy, 2013; Lakhani *et al.*, 2019). No entanto, apresenta baixa penetração através da córnea e das barreiras hematoculares devido ao seu alto peso molecular, caráter hidrofóbico e ligação às proteínas (Lakhani *et al.*, 2019).

Clotrimazol é utilizado por via tópica *off-label* (1%), na forma de gotas e/ou de pomada, contudo clotrimazol como monoterapia não é a escolha ideal (Srinivasan, 2004; Thomas e Kaliyamurthy, 2013; Lakhani *et al.*, 2019). Econazol 1% está disponível como um medicamento oftálmico com efeito semelhante ao da natamicina contra fungos filamentosos, recomendado na década de 1970, mas não há relatos recentes sobre o uso desse composto como terapia de primeira linha para ceratite micótica (Thomas, 2003b; Srinivasan, 2004).

Anfotericina B, natamicina e voriconazol são os únicos antifúngicos tópicos com evidências suficientes acerca de sua eficácia, segurança e indicações clínicas (Sahay *et al.*, 2019). No entanto, por conta dos desafios associados com polienos e azóis, a mais nova classe de antifúngicos, as equinocandinas, está sendo extensivamente investigadas como potenciais agentes terapêuticos em infecções fúngicas oftálmicas (Mahmoudi *et al.*, 2018).

Equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) possuem espectro antifúngico restrito. Fármacos desta classe apresentam atividade fungicida para *Candida* spp. e fungistática para *Aspergillus* spp., não são ativas contra espécies de *Fusarium*, mas são ativas contra outras espécies clinicamente relevantes (Srinivasan, 2004, Sahay *et al.*, 2019).

Esta classe de antifúngicos é mal absorvida pelo sistema gastrointestinal e os fármacos são, portanto, disponíveis apenas em formulação parenteral. Têm distribuição limitada aos tecidos oculares, levando a uma baixa concentração nestes tecidos (Sahay *et al.*, 2019). Caspofungina tópica (0,5%) *off-label* foi relatada como benéfica na ceratite micótica refratária e a formulação por via intravenosa tem sido usada com sucesso em casos de endoftalmite recorrente, assim como relatos de uso no tratamento de casos de ceratite refratária por espécies de *Alternaria* (Thomas e Kaliamurthy, 2013; Sahay *et al.*, 2019). Equinocandinas em formulações tópicas (caspofungina e micafungina), em monoterapia ou em associação, são relatadas com sucesso no tratamento de ceratites e endoftalmite por espécies de *Candida*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Trichosporon* (Patil e Majumdar, 2017; Mills *et al.*, 2020). No entanto, a maioria dos resultados clínicos bem-sucedidos com caspofungina e micafungina foram com uma terapia concomitante com outros antifúngicos como voriconazol, fluconazol e anfotericina B (Patil e Majumdar, 2017). Para que ocorra a penetração de equinocandinas é imprescindível que a barreira corneana não esteja intacta, sendo necessária a remoção da córnea durante a terapia (Patil e Majumdar, 2017). O uso oftálmico da micafungina em formulação tópica é *off-label*, utilizada em variados casos clínicos, com pontuais falhas clínicas frente a *Candida tropicalis* (Patil e Majumdar, 2017; Sahay *et al.*, 2019). Equinocandinas não são ativas contra espécies de *Fusarium* (Srinivasan, 2004).

Descrita eficácia maior ou semelhante em relação aos antifúngicos comumente utilizados, como o fluconazol. Além disso, caspofungina 0,5% demonstrou ser tão eficaz quanto a anfotericina B a 0,15% em tratamento da ceratite fúngica (Patil e Majumdar, 2017; Mills *et al.*, 2020). É imperativo comparar a eficácia e segurança das monoterapias de equinocandina usando vias

tópicas, orais, intraoculares e sistêmicas de administração (Patil e Majumdar, 2017). No caso da anidulafungina para infecções fúngicas oftálmicas, os estudos são ainda escassos, portanto, é essencial avaliar a anidulafungina quanto à sua farmacocinética ocular, eficácia, segurança e tolerabilidade, uma vez que apresentou atividade em altas doses (Patil e Majumdar, 2017).

As equinocandinas sistêmicas são geralmente bem toleradas com poucos efeitos adversos, que incluem dor de cabeça, distúrbio gastrointestinal, elevação dos níveis de enzimas hepáticas (aminotransferase) e leve reação à infusão (Sahay *et al.*, 2019). Contudo, o uso clínico de classes adicionais de antifúngicos, como as alilaminas e candinas, não é muito difundido (Thomas, 2003a).

Flucitosina possui espectro estreito de atividade, é mais eficaz contra *Candida* e alguns fungos filamentosos, limitada atividade contra *Aspergillus* spp., já as espécies de *Fusarium* são resistentes a este fármaco (Armstrong, 2000; Sahay *et al.*, 2019). Em infecções oculares, podem ser utilizadas formulações tópicas (1-1,5%) e sistêmicas. O uso como colírio é bem tolerado, no entanto, a molécula apresenta baixa penetração ocular (Armstrong, 2000; Thomas e Kaliamurthy, 2013; Sahay *et al.*, 2019).

Poli-hexametileno biguanida é um biocida ambiental geral, apresenta boa atividade *in vitro* contra fungos. Tem sido usado como conservante de produtos de uso oftálmico tópico. Solúvel em água e testado na forma de colírio 0,02% com sucesso relatado na prática clínica em muitas instituições (Thomas, 2003a; Czako *et al.*, 2019). Há uma estratégia de entrega de antifúngicos através de um escudo de colágeno, no formato de uma lente de contato, que deve ser reidratado antes do uso. Ainda, é capaz de auxiliar na promoção da cura epitelial da córnea. Através deste escudo, níveis do fármaco são entregues de forma confiável e com um número mínimo de aplicações, mas ainda depende da absorção e posterior liberação pelo escudo. Quando o antifúngico é hidrossolúvel e água é usada para reidratação, o fármaco fica preso nos interstícios do colágeno da matriz e será liberada conforme o escudo se dissolve e produzem níveis corneanos e aquosos comparáveis aos obtidos com terapia tópica frequente (Thomas, 2003a).

Atualmente, o único antifúngico para ser usado em escudos de colágeno é a anfotericina B (Thomas, 2003a).

Já os colírios contendo corticosteroides são contraindicados nas infecções fúngicas oculares, uma vez que são usados na tentativa de reduzir o dano ao tecido causado pela reação inflamatória dirigida contra um microrganismo e acabam piorando o curso da infecção fúngica existente, mas ainda não diagnosticada (Thomas, 2003b; Czakó *et al.*, 2019). Alegação de um possível "rebote inflamatório", complicação potencialmente devastadora na interrupção abrupta e pode ser confundida com o agravamento da infecção (Thomas, 2003a).

Mesmo nos casos em que o tratamento adequado é fornecido, cerca de um quarto dos pacientes terá falha da terapêutica farmacológica, o que acarretará em deficiência visual moderada ou grave e/ou irá necessitar de intervenções cirúrgicas, caras e frequentemente malsucedidas (Mills *et al.*, 2020). Embora tenham sido feitos muito avanços em relação ao tratamento destas infecções fúngicas oculares, 15-27% dos pacientes requer intervenção cirúrgica devido ao fracasso da terapia ou devido ao quadro avançado da doença na apresentação (Thomas, 2003b). Se a infecção da córnea progredir apesar de vigorosa terapia antifúngica, intervenção cirúrgica pode ser obrigatória. Qualquer um método ou uma combinação de vários métodos poderia ser contemplado, dependendo da natureza, extensão e gravidade da infecção da córnea (Thomas, 2003b; Czakó *et al.*, 2019). Para o tratamento de pequenas úlceras superficiais, os métodos preconizados incluem técnicas com maior ou menor potencial invasivo, como o desbridamento, uso de retalhos conjuntivais (para pequenas úlceras periféricas) em associação com terapia antifúngica, adesivos de tecido (cola de n-butil cianoacrilato) e uma lente de contato de curativo também têm sido defendidos (Thomas, 2003b). O transplante de membrana amniótica também pode ajudar na promoção da cura e reduz a inflamação na ceratite (Srinivasan, 2004; Kalkanci e Ozdek, 2010).

Reticulação de colágeno da córnea tem sido usada por fortalecer as ligações químicas entre os feixes de colágeno no estroma da córnea, acreditava-se que pudesse ter efeito antifúngico direto, além de retardar o derretimento da córnea (Mahmoudi *et al.*, 2018). Não havia melhora na cura microbiológica (Mills *et al.*, 2020). A terapia fotodinâmica (PDT) de Rosa Bengala é uma técnica única que envolve a ativação de uma substância química (chamada fotossensibilizador) pela luz. A fotoativação resulta na produção de espécies reativas de oxigênio que acabam por causar a morte (Mahmoudi *et al.*, 2018). Anteriormente mostrou inibição bem-sucedida do crescimento de *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium keratoplasticum* e tem sido usada no tratamento bem-sucedido de ceratite por *Fusarium* multirresistente em paciente pós-ceratoplastia. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que pode interromper o derretimento da córnea e causar reticulação das lamelas do estroma e enrijecimento da córnea (Mills *et al.*, 2020; Mahmoudi *et al.*, 2018).

A cirurgia pode ser necessária também para casos clínicos de ceratite fúngica onde há úlceras mais graves. Casos em que há perfuração iminente, perfuração superior a 2 mm ou quando não houver resposta à terapia médica, a ceratoplastia penetrante é indicada (Kalkanci e Ozdek, 2010; Thomas e Kaliamurthy, 2013). Em casos de ceratite leve a moderada a necessidade de ceratoplastia terapêutica (do inglês TPK) é de ~15%, entretanto, para casos graves é de ~40% (Mills *et al.*, 2020). É muito importante tentar manter a terapia o quanto for possível, para inviabilizar o fungo antes da cirurgia, com melhora no prognóstico. A cirurgia tenta remover o antígeno e elementos infecciosos e também tecido necrótico e outros detritos, que podem dificultar a cicatrização completa da lesão (Thomas e Kaliamurthy, 2013). A cirurgia também pode auxiliar aumentando a penetração do antifúngico, trazendo irrigação na forma de retalhos conjuntivais, ao estabilizar a superfície epitelial da córnea, fornecendo suporte tectônico ao globo quando a integridade é ameaçada, como no afinamento ou perfuração da córnea (Thomas, 2003a). O objetivo desta técnica é eliminar a infecção e restaurar a integridade do tecido. A taxa de cura de TPK

pode variar de 60-90% (integridade estrutural e erradicação da infecção), com uma taxa de recorrência de 6-15% e clareza do enxerto em 36 a 89% (Srinivasan, 2004; Kalkanci e Ozdek, 2010; Mills *et al.*, 2020). Quando não há resposta a nenhuma das opções terapêuticas realizadas e progressão da infecção, há o tratamento cirúrgico agressivo, que pode incluir exenteração orbital (Kalkanci e Ozdek, 2010).

Identificado o patógeno fúngico pela cultura, o regime terapêutico pode ser modificado (Thomas e Kaliamurthy, 2013). A resposta à terapia depende de inúmeros fatores relacionados ao hospedeiro, patógeno e terapia escolhida. Casos de infecções oculares superficiais, por espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Curvularia*, respondem bem à terapia com natamicina tópica, sem necessidade de intervenção cirúrgica. Já em casos de infecções mais profundas por estes fungos, intervenção cirúrgica pode ser necessária para a maioria dos pacientes, especialmente sem o uso de natamicina e, no caso das espécies de *Curvularia*, natamicina tópica em associação com cetoconazol oral (Thomas, 2003a; Thomas e Kaliamurthy, 2013). Infecções oculares por feo-hifomicetos, exceto *Curvularia* spp., em sua maioria, respondem à terapia antifúngica, natamicina tópica, cetoconazol oral e/ou tópico, oral cetoconazol e miconazol tópico, anfotericina B tópica sozinho ou itraconazol oral sozinho (Thomas e Kaliamurthy, 2013). Nos casos de infecções oculares por *Candida* spp. o uso de anfotericina B tópica sozinha ou em combinação com azóis sistêmicos em geral tem um bom prognóstico (Thomas, 2003a). Infecções oculares por *S. apiospermum* o desfecho está muito associado à gravidade com a qual o quadro é apresentado, com frequente necessidade de intervenção cirúrgica (Thomas, 2003a). Já os casos relacionados a *Acremonium* spp., requerem terapia antifúngica combinada à intervenção cirúrgica de uma ceratoplastia. Demais fungos, apresentam resultados variáveis, de acordo com a extensão da infecção (Thomas, 2003 A).

A ceratite micótica geralmente responde lentamente a terapia antifúngica, ao longo de um período de semanas. Sinais clínicos de melhora devem ser observados com cuidado (Thomas, 2003b; Thomas e Kaliamurthy, 2013). Diminuição da dor, diminuição do tamanho do infiltrado,

desaparecimento de lesões satélites, arredondando para fora das margens penugentas da úlcera e massas hiperplásicas ou folhas fibrosas na região de cicatrização de lesões fúngicas podem indicar sinais de melhora (Thomas e Kaliamurthy, 2013). Apesar de raspagens repetidas feitas durante o tratamento, pode não ser observado crescimento na cultura. Esta ausência de crescimento não indica, necessariamente, que o fungo foi erradicado, uma vez que pode haver proliferação de fungos profundamente no estroma. Dessa forma, a terapia deve ser continuada por pelo menos 6 semanas (Thomas, 2003a; Thomas e Kaliamurthy, 2013).

4.1.1.3.6.1. PROBLEMÁTICA ASSOCIADA À TERAPIA ANTIFÚNGICA OCULAR

A utilidade clínica dos agentes antifúngicos de uso nas infecções fúngicas oftálmicas tem sido desafiada por sua atividade antifúngica seletiva, surgimento de resistência e resistência cruzada e ausência de técnicas para desenvolver uma correlação robusta *in vitro/in vivo* (Lakhani *et al.*, 2019). Além disso, temos a importante questão da eficácia clínica de um agente antifúngico nestas infecções, que depende de maneira muito significativa da concentração alcançada no tecido ocular alvo (Thomas, 2003a). Assim, o tratamento dessas infecções, principalmente tópico, apresenta algumas dificuldades, uma vez que em inúmeros casos para que ocorra uma evolução positiva estes antifúngicos precisam penetrar os tecidos oculares e acessar estruturas internas do olho (Kaur e Kakkar, 2010). Contudo, para que isso ocorra, há uma série de fatores associados, dentre eles a massa molecular, a solubilidade e a capacidade de penetrar os tecidos oculares deste antifúngico, bem como a via de administração e o tempo de contato com o tecido ocular alvo (Thomas 2003b; Kaur e Kakkar, 2010). Dessa forma, há um número limitado de agentes antifúngicos e preparações terapêuticas, o que se deve também ao perfil de toxicidade ocular tópica e sistêmica desses agentes, principalmente devido ao uso de longo prazo (Kaur e Kakkar, 2010; Mehrandish e Mirzaeei, 2021).

Barreiras anatômicas e fisiológicas representam desafios para as formulações de antifúngicos administradas topicamente (Lakhani *et al.*, 2019). As barreiras fisiológicas são compostas pelo fluxo sanguíneo ocular, fluido lacrimal e enzimas e transportadores oculares. Composto de mucina, sais, enzimas e proteínas, o filme lacrimal demonstrou se ligar a classes de antifúngicos, o que representa mais um desafio à liberação ocular eficaz dos antifúngicos (Lakhani *et al.*, 2019). Temos mecanismos eficazes de remoção, que agem de maneira a manter a superfície ocular livre de substâncias estranhas. Nesta categoria, enquadram-se o reflexo de piscar, drenagem nasolacrimal rápida a partir do fluido lacrimal, rotatividade da lágrima e absorção não produtiva através da conjuntiva (Kaur e Kakkar, 2010). Já as barreiras anatômicas constituem-se das diferentes camadas celulares oculares, córnea, conjuntiva, esclera, retina e barreiras hematorretinal e hematoaquosa. Em conjunto, as barreiras hematoaquosa e hematorretiniana formam as barreiras hemato-oculares, que são compostas por junções endoteliais rígidas que inibem a passagem de agentes antifúngicos de alto peso molecular (Lakhani *et al.*, 2019). As barreiras anatômicas são significativamente responsáveis por alterar a penetração, a biodisponibilidade e a concentração intraocular do fármaco durante sua administração tópica e parenteral (Lakhani *et al.*, 2019).

Além disso, as propriedades físico-químicas dos agentes antifúngicos também influenciam a sua capacidade de penetrar as barreiras oculares e atingir o local alvo (Lakhani *et al.*, 2019; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Alto peso molecular e características hidrofóbicas elevadas (baixa solubilidade aquosa) são os principais desafios físico-químicos em relação à liberação ocular de agentes antifúngicos (Lakhani *et al.*, 2019; Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Os mecanismos de transporte através da córnea são o transporte paracelular (pelo espaço intercelular) e a difusão. Os agentes antifúngicos oculares parecem penetrar na córnea, majoritariamente, por difusão (Kaur e Kakkar, 2010). A solubilidade em tecido rico em lipídios é um determinante dessa difusão (Thomas, 2003a). O epitélio e o endotélio são ricos em lipídios, já o estroma tem alto teor de água, assim, age como uma barreira e limita a taxa do transporte

transcorneal. Logo, essa difusão depende favoravelmente da lipofilicidade do agente antifúngico. No caso de moléculas lipofílicas menores, são capazes de atravessar o epitélio da córnea, com papéis significativos do estroma e do endotélio. Já no caso das macromoléculas, o estroma oferece uma maior barreira (Kaur e Kakkar, 2010). De forma isolada e coletiva, todos os fatores citados afetam a farmacocinética dos agentes antifúngicos administrados (Lakhani *et al.*, 2019).

A distribuição de agentes antifúngicos, especialmente polienos e azóis, para os diferentes tecidos oculares infectados, ainda é um dos desafios formidáveis associados à farmacoterapia antifúngica, principalmente por causa da complexa anatomia do olho e das propriedades físico-químicas (Lakhani *et al.*, 2019). Compostos com massa molecular superior a >500 Da, como anfotericina B (924,10 Da), natamicina (665,75 Da) posaconazol ou cetoconazol (531,44 Da), possui pobre penetração no epitélio corneano íntegro devido à força do atrito que reduz cada vez mais a difusão (Thomas, 2003a; Kaur e Kakkar, 2010). A liberação ocular de anfotericina B é desafiadora devido, além do seu peso molecular, a sua baixa solubilidade aquosa. Dessa forma, dificultando sua penetração através da córnea e da barreira hematorretiniana e logo, há uma severa limitação da sua biodisponibilidade ocular (Lakhani *et al.*, 2019). Já a penetração ocular de moléculas com massas moleculares intermediárias, como miconazol (416,12 Da) ou fluconazol (306,30 Da), é provavelmente determinada por tamanho e solubilidade (Kaur e Kakkar, 2010) (FIGURA 7). O cetoconazol e o miconazol também exibiram penetração pobre através da córnea e das barreiras hematoculares devido aos seus pesos moleculares, características hidrofóbicas e ligação às proteínas (Lakhani *et al.*, 2019). No caso de compostos lipofílicos, como o itraconazol, facilmente cruzam as membranas das células epiteliais e endoteliais ricas em lipídios e o sangue (barreira hemato-aquosa). Contudo, itraconazol possui reduzida biodisponibilidade devido à baixa penetração na córnea, atribuída ao seu peso molecular (Kaur e Kakkar, 2010; Lakhani *et al.*, 2019). Além disso, a ligação do itraconazol às proteínas no filme lacrimal-lipídico e a alta hidrofobicidade contribuíram para sua baixa penetração na

córnea após administração tópica (Lakhani *et al.*, 2019). Já os compostos hidrofílicos cruzam mais facilmente o estroma corneano e os compostos bifásicos (solubilidade em lipídios e em água) penetram em todas as camadas da córnea (Kaur e Kakkar, 2010).

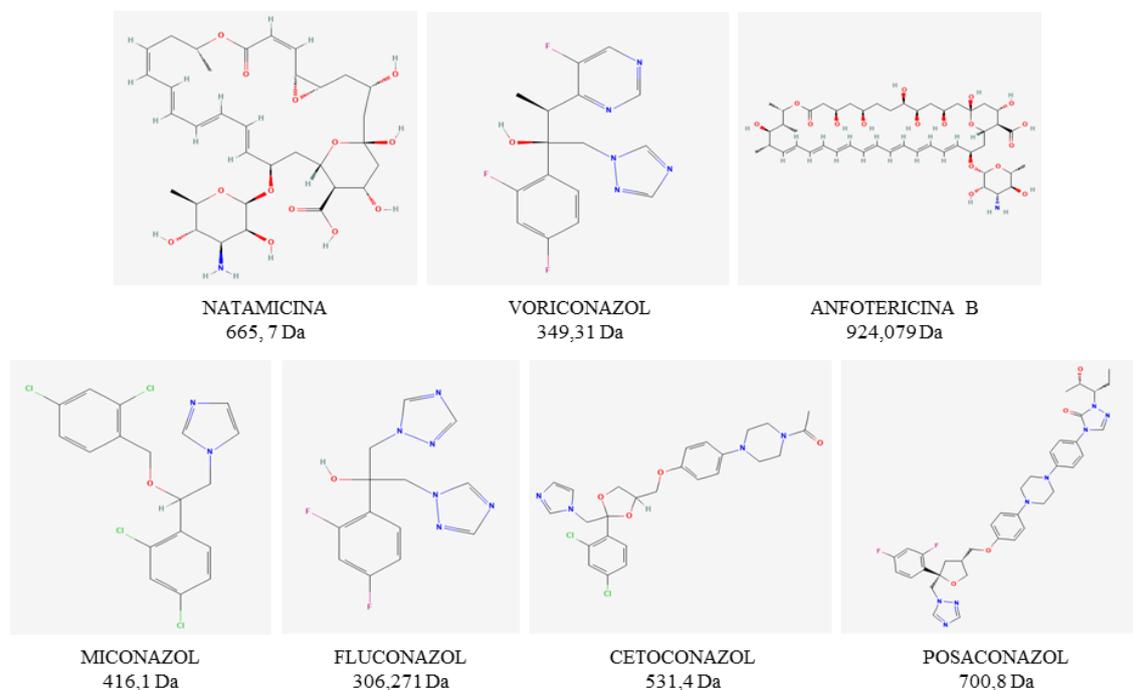


Figura 7. Principais fármacos utilizados em infecções fúngicas oculares e seus respectivos pesos e estruturas moleculares (Fonte: PubChem com adaptações).

A via tópica é a preferida para a administração de medicamentos no tratamento de infecções oftálmicas (Lakhani *et al.*, 2019). Formas tópicas possuem inúmeros benefícios: alta adesão do paciente, facilidade de uso, não invasividade, indolor, efeitos colaterais reduzidos e tratamento seletivo da câmara anterior (Mehrndish e Mirzaeei, 2021). Possui alta relevância no uso para terapia de ceratite fúngica, onde a integridade do epitélio da córnea e estroma superficial geralmente encontram-se rompidos pelo processo da doença em si (Thomas, 2003a). No entanto, essa via de administração de antifúngicos tópicos oculares é complicada, uma vez que é muito difícil fornecer e manter uma concentração adequada do fármaco (Kaur e Kakkar, 2010). A aplicação tópica frequente de gotas é um meio útil de alcançar os níveis necessários, no entanto é trabalhoso e pode ocasionar irritação (Thomas, 2003 A). Até o momento, entretanto, não há nenhum novo sistema de aplicação de antifúngico

ocular tópico disponível aprovado pela FDA (Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Pomadas e injeções subconjuntivais são alternativas que podem prolongar o tempo de contato entre o antifúngico e a córnea e o tecido conjuntival (Thomas, 2003a). Muitas vezes, a única maneira de atingir a concentração desejada do agente antifúngico no local pretendido é com formas injetáveis, contudo, são extremamente invasivas (Mehrandish e Mirzaeei, 2021). Além disso, as injeções subconjuntivais podem ser dolorosas para o paciente e inconveniente para o médico, com risco de causar danos locais no tecido ocular (Thomas, 2003a).

A liberação não uniforme do agente antifúngico do fluido lacrimal para os tecidos oculares ocasiona um pico inicial de concentração do agente nos tecidos, seguido por um período de baixa concentração, podendo atingir níveis subterapêuticos (Kaur e Kakkar, 2010). Até a próxima aplicação, esta concentração tecidual subinibitória pode se prolongar por períodos longos. Dessa forma, o paciente é exposto ao risco de efeitos tóxicos e de falha terapêutica. Para uma ação eficaz sobre o patógeno fúngico, inibindo o seu crescimento, as formulações devem liberar adequadamente o agente antifúngico, com penetração eficiente nos tecidos, de maneira que atinja concentrações terapeuticamente eficazes (Kaur e Kakkar, 2010). Ainda, na grande maioria dos casos, as infecções fúngicas oculares ainda estão sendo tratadas empiricamente, com base apenas nas características clínicas. Isso também está contribuindo para o mau prognóstico e resistência dos microrganismos (Mills *et al.*, 2020).

4.1.1.3.7. RESISTÊNCIA

Nas últimas décadas, houve um aumento universal na utilização de fármacos antifúngicos, o que está associado às alterações na epidemiologia e perfis de suscetibilidade antifúngica (Lamoth *et al.*, 2018). A resistência é um problema emergente mundial e que complica ainda mais a escolha da terapia antifúngica apropriada (Pappas *et al.*, 2018).

A exposição prévia a antifúngicos, como no caso do tratamento profilático com antifúngico poderia, teoricamente, favorecer o surgimento de resistência adquirida, além de levar à seleção de espécies menos suscetíveis

(Goemaere *et al.*, 2017; Pappas *et al.*, 2018). Devido ao uso crescente dos compostos antifúngicos, a emergência de resistência tem sido cada vez mais relatada (Pappas *et al.*, 2018). A resistência tem sido um dos maiores desafios associados ao arsenal antifúngico, especialmente os antifúngicos azólicos (Lakhani *et al.*, 2019).

Enquanto a classe dos antifúngicos polienos está geralmente associada à resistência primária, ou seja, algumas espécies fúngicas são inerente e naturalmente resistentes a esta classe. Neste caso podemos citar *Candida lusitaniae*, *Aspergillus terreus* e *Trichosporon beigelii* frente à anfotericina B e *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* e *Candida parapsilosis* frente à natamicina (Lakhani *et al.*, 2019). Já para a classe dos azóis podem ser observadas tanto a resistência primária como secundária (resistência devido a uma exposição prolongada do fungo ao antifúngico). Como exemplos, temos a *Candida krusei*, que é inerentemente resistente ao fluconazol, e o surgimento de resistência secundária da *C. glabrata* frente ao fluconazol devido ao uso clínico contínuo e indiscriminado. Ainda, temos o problema da resistência cruzada, que também tem sido um dos desafios para a classe dos antifúngicos azólicos (Lakhani *et al.*, 2019). Aqui, temos o uso contínuo e difundido de itraconazol e fluconazol que resultou no desenvolvimento de espécies resistentes a eles, bem como a outros antifúngicos (Patil e Majumdar, 2017; Lakhani *et al.*, 2019). O surgimento de resistência e resistência cruzada frente aos azóis mais novos foi demonstrado através de relatos de infecções oculares por *Fusarium* e *Aspergillus*, que se apresentaram resistentes ao voriconazol. Este desafio da resistência associada ao voriconazol teve como estratégias de combate o uso de posaconazol substituindo o voriconazol no primeiro caso e o uso de método cirúrgico no último. Na atualidade, o posaconazol (uso *off-label*) é considerado uma das terapias mais eficazes em casos de ceratite fúngica resistente e outras infecções fúngicas oculares refratárias (Lakhani *et al.*, 2019).

Há uma carência de formulações oftálmicas aprovadas de antifúngicos polienos e azóis, para uso na farmacoterapia de infecções fúngicas oculares. Isso leva ao uso não otimizado e *off-label* do agentes antifúngicos destas classes,

umentando as chances de resistência e resistência cruzada, que já vem sendo relatadas (Słowiak *et al.*, 2015; Lakhani *et al.*, 2019). Além disso, ausência de formulações aprovadas, padronizadas e comercializadas, exclusivas para infecções fúngicas oculares, leva à falta de comparadores válidos (controles). Dessa forma, dificultando a avaliação da eficácia, atividade e potência das formulações, bem como das dosagens utilizadas atualmente na farmacoterapia antifúngica ocular. Ainda, se torna mais complexo determinar a correlação entre os resultados dos testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* e os prováveis desfechos clínicos (Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019). Contudo, a determinação *in vitro* do padrão de suscetibilidade pode ser usada para fornecer dados úteis para os médicos (Mahmoudi *et al.*, 2018).

Além disso, para combater os desafios do futuro surgimento de resistência e resistência cruzada e para melhorar os resultados da farmacoterapia, é de suma importância o desenvolvimento de antifúngicos de nova geração e de novas moléculas/classes. Ainda, com propriedades físico-químicas superiores aqueles disponíveis e um amplo espectro antifúngico e/ou agentes potencializadores. Outra opção são as associações, com objetivo de aumentar a atividade contra cepas resistentes e/ou para reduzir a dose e a toxicidade associada (Lakhani *et al.*, 2019). As associações de agentes antifúngicos e/ou não antifúngicos, em casos de fungos resistentes, têm demonstrado resultados promissores (Mahmoudi *et al.*, 2018). Os objetivos de novas estratégias e abordagens de agentes antifúngicos é reduzir o tempo de tratamento, alta penetração e afinidade com as camadas de células do tecido acometido ou boa penetração pelas camadas celulares oculares, com o intuito de uma alta concentração do agente antifúngico no local acometido pelo patógeno (Kaur e Kakkar, 2010).

4.1.1.3.8. BIOFILMES FÚNGICOS

Fatores de virulência são essenciais no estabelecimento da infecção, embora não o sejam na sobrevivência *in vitro* dos microrganismos. Estão diretamente associados à transição entre comensalismo e oportunismo e a

redução da suscetibilidade (Cui *et al.*, 2015; Bujdáková, 2016; Silva *et al.*, 2017). A patogenicidade da infecção, ou seja, a capacidade do microrganismo infectar é mediada pela variabilidade de adaptação e os fatores de virulência, como a aderência e a formação de biofilme, secreção de enzimas hidrolíticas e as alterações morfológicas (Silva *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2015; Sakita *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017).

A colonização se inicia com a aderência do microrganismo em uma superfície, esta por sua vez, contribui para a persistência no hospedeiro e é fundamental para o subsequente estabelecimento do processo infeccioso. Essa adesão pode ocorrer em superfícies bióticas, como o tecido do hospedeiro, ou em superfícies abióticas, como os dispositivos médicos, com posterior desenvolvimento de biofilmes (Silva *et al.*, 2012; Sakita *et al.*, 2017; Pappas *et al.*, 2018). No ambiente, os microrganismos encontram-se, basicamente, sob duas formas de crescimento: planctônico e biofilme. No entanto, por proporcionar vantagens de sobrevivência, o biofilme representa cerca de 80% deste crescimento (Iñigo *et al.*, 2012; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

O biofilme é descrito, usualmente, como uma comunidade altamente estruturada, coordenada e funcional de células aderidas a uma superfície, associadas umas as outras (com propriedades diversas das suas respectivas células planctônicas). Há uma matriz extracelular protetora, autoproduzida, embebendo estas células, resultando em um excepcional grau de organização (Ramage *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2017). Sua formação ocorre através de quatro etapas principais: fase inicial ou de aderência, fase intermediária ou proliferação, fase final ou maturação e fase de dispersão (FIGURA 8).

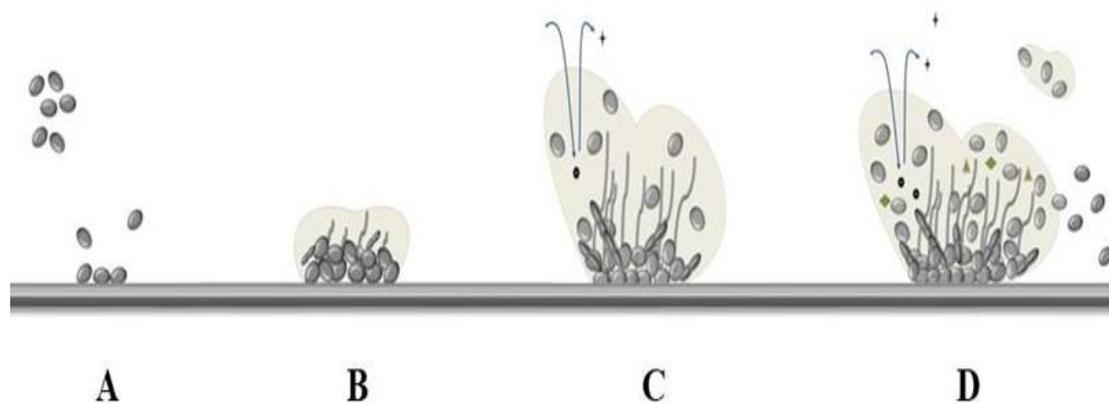


Figura 8. Representadas as etapas de formação de um biofilme por leveduras. Fase inicial ou de aderência (A): adesão de células planctônicas a uma superfície; Fase intermediária ou proliferação (B): Proliferação celular e formação de matriz extracelular; Fase final ou maturação (C): biofilme formado maduro, com espessamento da matriz extracelular, maior diferenciação celular e sistema quórum-sensing desenvolvido; Fase de dispersão (D): biofilme em fase de dispersão, liberando células que poderão aderir-se a outras superfícies e formar novos biofilmes, dando continuidade ao ciclo (Fonte: Autora).

Fase inicial ou de aderência: a adesão inicial das células a uma superfície, biótica ou abiótica, é um processo mediado por várias proteínas da parede celular. Este processo ocorre através de interações químicas com moléculas dessas superfícies, ligação a outras células, tanto epiteliais como microbianas (Bujdáková, 2016; Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Ao final desta etapa temos a formação de uma colônia discreta (Cavalheiro e Teixeira, 2018).

Fase intermediária ou proliferação: esta fase é caracterizada pela formação de camadas, devido à proliferação das células aderidas à superfície. Conforme a espécie fúngica, formam-se pseudo-hifas, hifas e blastoconídios, além da formação da matriz extracelular. Assim, gerando uma estrutura tridimensional (Bujdáková, 2016; Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Lohse *et al.*, 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Cabe ressaltar que substâncias poliméricas extracelulares são produzidas e secretadas após a organização das células, formando uma matriz extracelular composta de polissacarídeos, carboidratos, proteínas, ácido desoxirribonucleico (do inglês DNA) e produção de moléculas de sinalização (Bujdáková, 2016; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

Fase final ou maturação: o biofilme encontra-se em uma estrutura tridimensional, com camadas celulares circundadas por matriz extracelular. Então, entra em um processo de maturação, onde é desenvolvida a organização final para manutenção da estrutura. Ocorre o espessamento da matriz extracelular (formando uma rede densa), formação de canais de água (troca de nutrientes) e desenvolvimento do sistema quórum-sensing da estrutura (Iñigo *et al.*, 2012; Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Lohse *et al.*, 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Dessa forma, os biofilmes maduros se apresentam como estruturas tridimensionais altamente diferenciadas, com uma estrutura complexa, com camadas distintas (Yousif *et al.*, 2015; Lohse *et al.*, 2017).

Fase de dispersão: embora este processo venha ocorrendo ao longo da formação do biofilme, o auge da dispersão celular ocorre nos biofilmes maduros, do qual são liberadas células e fragmentos não aderidos, o que leva à propagação da infecção (Iñigo *et al.*, 2012; Lohse *et al.*, 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). As células e fragmentos dispersos podem se estabelecer em outros locais e iniciar a formação de outro biofilme (Yousif *et al.*, 2015).

Variáveis relacionadas ao hospedeiro, ao gênero e à espécie do microrganismo, bem como fatores ambientais, influenciam na formação de biofilme. Causam alterações na formação e na arquitetura do biofilme e, dessa forma, na suscetibilidade à terapia antifúngica (Ramage *et al.*, 2012; Chandra e Mukherjee, 2015; Costa-Orlandi *et al.*, 2017). Há variabilidade entre espécies, as diferenças ocorrem em termos de capacidade de formação de biofilme, morfologia, arquitetura, propriedades de adesão, características referentes à matriz extracelular (como a sua composição) e perfil de suscetibilidade antifúngica. Dessa forma, exibindo comportamentos patogênicos distintos (Chandra e Mukherjee, 2015; De Cremer *et al.*, 2015; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

Ao longo dos anos, grande número espécies fúngicas demonstrou capacidade de formação de biofilmes, dentre elas, espécies de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Candida*, dentro dos quais temos as principais espécies responsáveis

pelas infecções fúngicas oftálmicas (Słowiak *et al.*, 2015; Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Girardot e Imbert, 2016). Aproximadamente 80% das infecções microbianas em seres humanos têm os biofilmes como responsáveis, direta ou indiretamente (Ramage *et al.*, 2012; De Cremer *et al.*, 2015). A FIGURA 9 apresenta biofilmes fúngicos formados em lentes de contato.

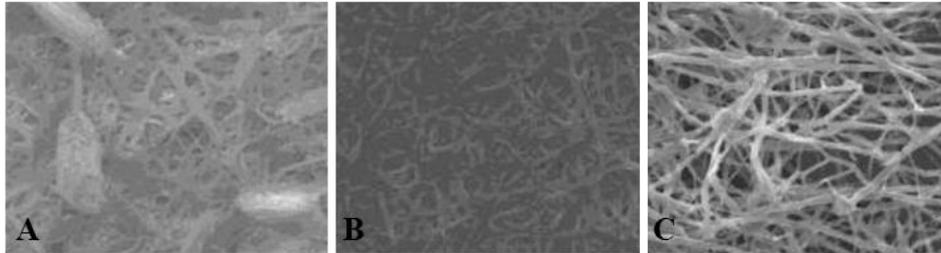


Figura 9. Biofilmes fúngicos em lente de contato: A) *Aspergillus fumigatus*; B) *Fusarium solani*; C) *Aspergillus terreus* (Adaptado de: Leite ECS, 2014).

Os biofilmes podem desempenhar um importante papel nos casos de endoftalmite relacionada a implantes, como dispositivos de drenagem de glaucoma, ceratopróteses (córneas artificiais) e, possivelmente, lentes intraoculares (LIOs) (Durand, 2017). Representam um grave problema nas infecções oftálmicas, pois estão fortemente associados a infecções recalcitrantes, uma vez que há uma diminuição dramática na suscetibilidade aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis, que já são limitados (De Cremer *et al.*, 2015; Fuentesfria *et al.*, 2017). Ainda, temos a questão do diagnóstico e presença de biofilme, que é difícil. Para isso, alguns fatores devem ser considerados, como a presença de sinais e sintomas clínicos de infecção fúngica, fatores de risco que são predisponentes ao desenvolvimento de biofilme (como lentes de contato), evidência que correlacione a infecção com o fator de risco (Ramage *et al.*, 2014).

Ainda, a formação de biofilme está fortemente associada a infecções recalcitrantes, uma vez que demonstraram tolerância aumentada frente ao sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, apresentam uma diminuição expressiva da suscetibilidade aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis (Nett, 2014; De Cremer *et al.*, 2015; Fuentesfria *et al.*, 2017). Isto ocorre devido à matriz extracelular, que possui efeito de proteção sobre a estrutura do biofilme,

conferindo proteção do ambiente, resistência ao estresse físico e químico, cooperação e coordenação metabólica. Ainda, atua como um sistema digestivo externo e de fornecimento de nutrientes e energia às células (Ramage *et al.*, 2012; De Cremer *et al.*, 2015; Fuentesfria *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). Dessa forma, as terapias destinadas a células planctônicas tornam-se ineficazes frente aos biofilmes já estabelecidos em uma superfície (Sav *et al.*, 2018).

As células sésseis (células do biofilme) apresentam alterações funcionalmente significativas em sua expressão gênica e em sua taxa de crescimento em relação às células planctônicas (Iñigo *et al.*, 2012; Yousif *et al.*, 2015). Dessa forma, apresentam-se mais citotóxicas, virulentas e com maior capacidade de adesão às superfícies, por consequente, formando novos biofilmes (Ramage *et al.*, 2014; Bouza *et al.*, 2015; Lohse *et al.*, 2017). Outra importante vantagem das células sésseis está associada ao fato das células planctônicas geralmente dependerem de mudanças genéticas irreversíveis para um fenótipo de resistência. Enquanto a recalcitrância dos biofilmes está correlacionada à sua presença física e alta densidade celular, o que dificulta a penetração dos agentes antifúngicos. Isso leva a uma penetração irregular e seleção de células resistentes. A liberação destas células pelo biofilme pode, posteriormente, ocasionar outras infecções (Perlin, 2014; Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017).

As células *persisters* representam uma pequena subpopulação das células sésseis normais, de 0,01-10% da população total. São “variantes latentes”, metabolicamente inativas, ou seja, em um estado espontâneo de dormência e não-divisório, assim, com alta resistência aos agentes antifúngicos. O tratamento antifúngico inadequado, muitas vezes, de forma repetida, elimina as células normais, porém, as células *persisters* podem permanecer. Dessa forma, com a conclusão da terapia, pode ocorrer a restauração do biofilme e reinfecções (Ramage *et al.*, 2012; De Cremer *et al.*, 2015; Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Capote-Bonato *et al.*, 2018).

A maturação do biofilme está correlacionada fortemente ao descréscimo expressivo na suscetibilidade do biofilme (Capote-Bonato *et al.*, 2018). Isso se

deve, em grande parte, a sua capacidade de neutralização ou ligação aos agentes antifúngicos, assim, impedindo o acesso ao alvo, na superfície ou na célula fúngica (De Cremer *et al.*, 2015; Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017; Kernien *et al.*, 2018). O polissacarídeo extracelular β -1,3-glucano, presente na matriz extracelular, sequestra azóis, atuando como um “filtro” e impedindo que atinjam as células do biofilme, agem sobre equinocandinas, pirimidinas e polienos. Além disso, confere espessura ao biofilme e maior proteção (Ramage *et al.*, 2012; De Cremer *et al.*, 2015; Capote-Bonato *et al.*, 2018; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Ainda, impede a ação direta do sistema imunológico do hospedeiro sobre as células sésseis, além de proteger de danos radioativos, oxidativos e físicos (De Cremer *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2017).

O grau em que a resistência dos biofilmes frente aos agentes antifúngicos se apresenta varia significativamente. Os biofilmes podem apresentar-se resistentes a concentrações até 2000 vezes acima da CIM das respectivas células planctônicas (Nett, 2014). O reflexo na aplicação clínica se apresenta na dose necessária para tratar a infecção e erradicar o biofilme, uma vez que há o risco de exceder as concentrações mais altas de antimicrobiano que podem ser atingidas terapêuticamente, representando um grande problema (Ramage *et al.*, 2012). Essas terapias podem apresentar alguns problemas associados, como o seu perfil de toxicidade no paciente (Iñigo *et al.*, 2012; Nett, 2014).

A terapia antifúngica destas infecções associadas ao biofilme apresenta-se, geralmente, ineficaz, o que leva a complicações no paciente. Dessa forma, ocasiona significativa morbidade e mortalidade, o que se correlaciona ao expressivo aumento dos custos relacionados a este paciente (De Cremer *et al.*, 2015; Fuentefria *et al.*, 2017). Logo, ocorre uma limitação das opções de tratamento atualmente disponíveis, que já se apresenta limitado por si só no caso de infecções oculares, e acaba se tornando ainda mais crítico, isso leva a necessidade de novas estratégias terapêuticas e/ou compostos para o combate dessas infecções (De Cremer *et al.*, 2015).

4.1.1.4. NOVAS ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO

Infecções fúngicas oculares, por si só, já são graves e complexas, visto que o diagnóstico clínico, o isolamento do patógeno fúngico e a terapêutica efetiva são demasiadamente desafiadores (Słowik *et al.*, 2015; Austin *et al.*, 2017). A penetração deficiente de drogas antifúngicas no tecido ocular e a baixa disponibilidade comercial de formulações de medicamentos são problemáticas (Słowik *et al.*, 2015). Apesar da extensa pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas antifúngicas, a terapia disponível para o tratamento das infecções fúngicas oculares são limitados, baseando-se em polienos e azólicos (Vandeputte *et al.*, 2012; Izquierdo *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2017 A; Lakhani *et al.*, 2019). Além disso, desde 1960, com a aprovação da natamicina tópica pelo FDA, nenhum outro fármaco específico para infecções fúngicas oftálmicas foi aprovado (Lakhani *et al.*, 2019).

A introdução de novos agentes antifúngicos e/ou de novas estratégias terapêuticas está relacionada a notáveis dificuldades. No entanto, o desenvolvimento de novas abordagens para subjugar algumas questões associadas às terapias atuais torna-se necessário. Questões significativas como o perfil de toxicidade, vias restritas de administração, biodisponibilidade baixa nos locais-alvo, formação de biofilmes e questões próprias do paciente são desafiadoras neste processo (Fuentefria *et al.*, 2017; González-Lara *et al.*, 2017). Outro ponto muito importante são as mudanças que vêm ocorrendo na epidemiologia das espécies, que, devido às suscetibilidades diferenciais, suscitarão em alterações nas recomendações de tratamento. Dessa forma, determinando a necessidade fundamental de novos agentes antifúngicos, principalmente com novos mecanismos de ação. Logo, novas abordagens são importantes para inovação da terapia das infecções, especialmente aquelas persistentes (Pappas *et al.*, 2018).

4.1.1.4.1. NOVOS COMPOSTOS

A pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos são necessários e urgentes, objetivando superar os desafios associados às terapias antifúngicas atualmente disponíveis (Kathiravan *et al.*, 2012; González-Lara *et*

al., 2017). Além disso, o aumento crescente de microrganismos resistentes frente aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis, muitas vezes relacionados à formação de biofilme, bem como a emergência de novos patógenos, torna necessário projetar continuamente novos agentes antifúngicos (Ajani *et al.*, 2016). A identificação de compostos com atividade antifúngica e frente ao biofilme, que sejam eficazes, inclusive sobre as células *persisters*, com ação isolada ou em associação aos antifúngicos convencionais ou que facilite a ação do sistema imunológico, é muito importante (Nett, 2014).

Neste campo, a pesquisa atual, além dos fármacos e classes já disponíveis, também foca-se no rastreamento de quimiotecas existentes, medicamentos já aprovados não patenteados e síntese racional de novos compostos, procurando por candidatos a novos agentes antifúngicos (Bujdáková, 2016). O desenvolvimento contínuo de novos agentes antifúngicos é importante, principalmente estruturas quimicamente diversificadas em termos de substituições, como os esqueletos heterocíclicos. Tanto para a continuidade da pesquisa da atividade biológica geral como específica, com foco em pontos críticos, como as infecções de difícil tratamento (Ajani *et al.*, 2016).

Desta maneira, a 8-HQ e seus derivados representam alternativas importantes, uma vez que possuem uma gama de funções biológicas, dentre elas, a atividade antifúngica (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016). A variabilidade ampla de possíveis modificações, em várias posições da molécula de 8-HQ provou que esta estrutura é de grande valor em muitos compostos biologicamente ativos e em fármacos comercializados, um exemplo bem conhecido é o clioquinol (Oliveri e Vecchio, 2016).

4.1.1.4.1.1. DERIVADOS DE 8-HIDROXIQUINOLINA

A 8-HQ (oxinas, 8-quinolinóis, 8-HQs) possuem um anel heterocíclico de seis membros fundido a um anel benzênico com uma hidroxila no carbono 8 (Sashidhara *et al.* 2009; Prachayasittikul *et al.*, 2013; Kadri *et al.*, 2014; Oliveri e Vecchio, 2016). As 8-hidroxiquinolinas e seus derivados são uma subclasse de quinolinas (FIGURA 10) Têm sido utilizadas na agricultura, como fungicida, e

nas indústrias têxtil, madeireira e de papel, como conservante (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016).

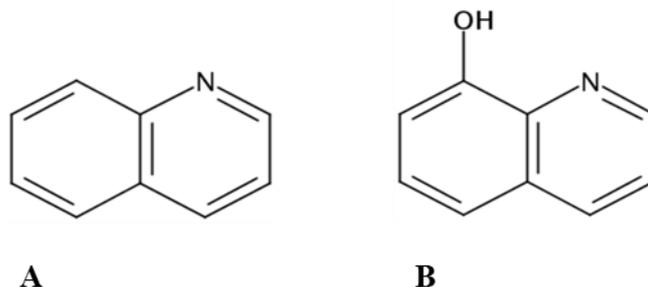


Figura 10. Representação da estrutura química: A) núcleo quinolínico; B) 8-hidroxiquinolina (Fonte: Autora).

Estas moléculas possuem capacidade de quelar íons metálicos, demonstrando preferência por Cu^{2+} e Zn^{2+} , conforme tendência: $\text{Mn}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Em virtude de que íons metálicos apresentam função muito importante nos processos biológicos e que a sua homeostase é necessária na manutenção do equilíbrio, a quelação, entre vários fatores, é importante para a atividade farmacológica (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016). Logo, como resultado, esta subclasse possui uma grande variedade de funções biológicas (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016). Além do mais, uma grande vantagem das 8-HQs, é a variabilidade de modificações possíveis. Mesmo o grupo hidroxila pode ser facilmente alquilado ou acilado, bem como é fortemente ativador de substituintes orto/para, então, as posições 5 e 7 podem ser facilmente funcionalizadas (Oliveri e Vecchio, 2016). Dessa forma, são candidatos promissores a serem otimizados, de maneira a potencializar suas atividades, melhorar o perfil de toxicidade e o espectro de atividade biológica, inclusive de microrganismos (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016).

Nas últimas décadas, houve um crescimento exponencial do interesse em 8-HQs e seus derivados como base de pesquisa para novos candidatos a fármacos, devido a sua variada gama de atividades biológicas, como antibacterianos, antimaláricos, neuroproteção, efeitos anticancerígenos, anti-HIV

e antifúngicos (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016; Pippi *et al.*, 2017). Dentro da atividade antimicrobiana, derivados 8-HQs demonstraram exercer atividade contra uma variedade de microrganismos tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, do inglês MRSA), *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e não-*albicans*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*, além de espécies de fungos dermatofíticos (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Pippi *et al.*, 2017).

Ainda, há inúmeros derivados desta molécula depositados em patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI - número do registro: BR1020170146740), cujo potencial antifúngico se mostra promissor (Joaquim *et al.*, 2019). Neste contexto, uma série de trabalhos visando a obtenção de novos derivados de 8-HQ, seus perfis de atividade antifúngica, toxicidade e mecanismo de ação são encontrados na literatura. Estes derivados apresentam atividade antifúngica frente a inúmeras cepas de *Candida* spp. e de fungos dermatofíticos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*, bem como níveis variados de atividade sobre biofilmes de *Candida* spp. (Pippi *et al.*, 2017; Joaquim *et al.*, 2019; Pippi *et al.*, 2018; Pippi *et al.*, 2021; Reginatto *et al.*, 2022). Ainda, seu mecanismo de ação foi parcialmente descrito e também são apresentados estudos que demonstraram que alguns destes derivados apresentam a possibilidade de uso por via oral em infecções sistêmicas por *Candida* spp. (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016; Joaquim *et al.*, 2019; Pippi *et al.*, 2019; Pippi *et al.*, 2021).

O derivado de 8-HQ, 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil)sulfonamida, denominado por PH151, se encontra no depósito de patente apresentado acima e já foi parcialmente caracterizado (FIGURA 11). Joaquim *et al.* (2019) demonstraram que este composto possui ação em fungos leveduriformes do gênero *Candida* e fungos dermatofitos. No entanto, o mecanismo de ação deste composto ainda não foi totalmente elucidado. Ramagem *et al.* (2007) demonstraram, utilizando o ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) que possui capacidade quelante de íons, uma ação sobre a formação de hifas por *Candida*

albicans, na qual ocorreu a inibição da formação das mesmas. Tendo o conhecimento da capacidade de quelante de íons metálicos que derivados de 8-HQ apresentam, Pippi *et al.* (2018) confirmaram o potencial de inibição da formação de pseudo-hifas em espécies de *Candida* pelo composto PH151 (Prachayasittikul *et al.*, 2013; Oliveri e Vecchio, 2016). Ainda, foi possível observar uma ação parcial na parede celular do fungo (Pippi *et al.* dados não publicados). Pippi *et al.* (2021) também avaliaram o perfil de toxicidade do composto PH151 através de modelos alternativos. O composto demonstrou baixa toxicidade em modelos de moscas *Drosophila melanogaster* e em embriões de galinha (Pippi *et al.*, 2021). Ainda, Joaquim *et al.* (2019) avaliaram a citotoxicidade do composto PH151 em linhagem celular derivada do rim do macaco verde africano (células VERO), com resultados positivos, indicando baixa citotoxicidade, além de demonstrar baixa toxicidade tópica no teste da orelha suína e perfil não irritante no teste (do inglês HET-CAM).

Ainda seguindo a linha de uso de derivados de 8-HQ, temos a opção de reposicionamento de fármacos, que representa uma opção potencialmente ágil e menos custosa em relação ao desenvolvimento e síntese de novos compostos. Isso se deve ao fato de que neste caso a molécula já foi utilizada anteriormente ou ainda é utilizada para outros fins, dessa forma, já possui estudos anteriores (Chang *et al.*, 2017 A; Fuentefria *et al.*, 2017). Neste sentido, por meio da tecnologia farmacêutica, a pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações antifúngicas pode representar uma abordagem idealmente promissora, possibilitando a reutilização de fármacos, superando ou simplesmente amenizando algumas de suas deficiências (Chang *et al.*, 2017; Fuentefria *et al.*, 2017).

Um exemplo bem conhecido é o clioquinol, um derivado halogenado de 8-HQ, o 5-cloro-7-iodo-quinolin-8-ol (FIGURA 11) (Mao e Schimmera, 2008; Oliveri e Vecchio, 2016). Entre as décadas de 50 e 70, o clioquinol foi usado como agente antiparasitário oral no tratamento da amebíase intestinal, com mecanismo de ação desconhecido (Mao e Schimmera, 2008). No entanto, houve relatos de neurotoxicidade (neuropatia mielo-óptica subaguda - SMON) em

pacientes japoneses, afetando, supostamente, cerca de 10.000 pessoas na década de 1970. Devido a isso, a formulação oral foi retirada do mercado. Formulações tópicas ainda estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas e parasitárias (Mao e Schimmera, 2008; Bareggi e Cornelli, 2010).

Na atualidade, ainda não há um convencimento desta associação entre clioquinol e SMON, uma vez que é extremamente rara fora do Japão. Dessa forma, existem suposições e hipóteses na tentativa de explicar este fato, dentre elas a relação dos efeitos neurotóxicos à deficiência de vitamina B12 e a redução de sua absorção pelo clioquinol, na qual a suplementação concomitante poderia resolver. Outras hipóteses a associam ao tipo de formulação utilizada no Japão ou a suscetibilidade genética da população em questão (Mao e Schimmera, 2008; Bareggi e Cornelli, 2010).

Sua ação biológica inclui atividade antifúngica, amplamente estudada, com um espectro de ação amplo, incluindo espécies dos gêneros *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*), *Microsporum* (*M. canis* e *M. gypseum*, hoje renomeado como *Nannizzia gypsea*) e *Trichophyton* (*T. mentagrophytes* e *T. rubrum*) (Pippi *et al.*, 2017; da Costa *et al.*, 2020). Ao longo dos últimos anos, dada a sua eficácia, estudos envolvendo o clioquinol vêm crescendo, assim como de novos compostos derivados, com um perfil toxicológico aprimorado (Bareggi e Cornelli, 2010).

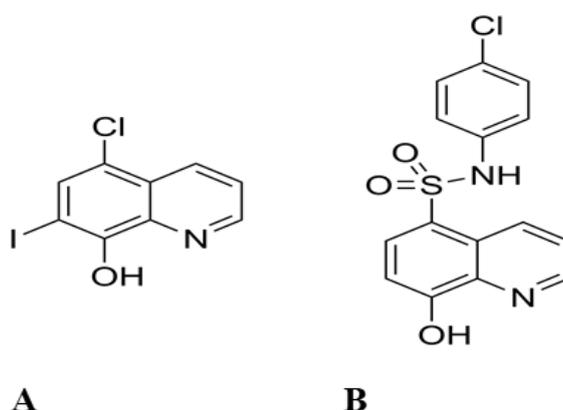


Figura 11. Representação da estrutura química dos derivados de 8-hidroxiquinolina: A) clioquinol e B) PH151 (Fonte: Autora).

4.1.1.4.2. ASSOCIAÇÕES

No entanto, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos consiste em um processo elaborado, exige um período grande de tempo e alto custo. Devido, em grande parte, aos pré-requisitos exigidos para aprovação (De Cremer *et al.*, 2015). Portanto, torna-se necessário a pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens. Como alternativa ao processo de desenvolvimento de novos fármacos, têm-se utilizado a estratégia de associação de compostos. Esta opção inclui inúmeros benefícios potenciais: combinação de diferentes mecanismos de ação, que, atuando juntos, têm sua ação ampliada sobre as células fúngicas; possibilita ampliar o espectro de ação; permite o uso de doses menores minimizando a toxicidade; redução dos microrganismos resistentes; redução de custos da terapia e permite a reutilização/reposicionamento de compostos (Cui *et al.*, 2015; Robbins *et al.*, 2016; Fuentefria *et al.*, 2017).

O principal objetivo da associação entre dois ou mais compostos é a obtenção de um efeito de ação sinérgica. O sinergismo ocorre quando a associação demonstra um efeito de ação maior do que a soma de seus efeitos isolados. Embora nem sempre considerado na literatura, há a possibilidade de um efeito aditivo entre os compostos associados, isso ocorre quando a soma da ação dos compostos isolados é igual à ação deles em combinação (Oliveira, 1986; De Cremer *et al.*, 2015). Ainda, os compostos associados podem agir maneira independente entre si (efeito de associação indiferente), ou seja, não há interferência de um sobre a ação do outro, em nenhum aspecto. Contudo, a associação entre os compostos pode apresentar efeito antagônico, que ocorre quando a atividade em associação é menor que o efeito de cada composto isolado. Pode ser observado quando se combinam dois compostos que competem pelo mesmo alvo de ação (Oliveira, 1986).

A identificação de interações sinérgicas pode ser feita através da triagem em coleções de compostos, buscando mecanismos de ação complementares, parcial ou totalmente conhecidos, e que aumentem a eficácia das terapias antifúngicas já disponíveis. Efeito de associação sinérgico pode ser

observado mesmo em associações de agentes antifúngicos com compostos, a princípio, sem atividade antifúngica (Cui *et al.*, 2015; Robbins *et al.*, 2016). Existem alguns estudos *in vitro* que fornecem evidências de um efeito sinérgico entre antifúngicos, inclusive associados a agentes que não possuem ação antifúngica, contra fungos isolados de pacientes com infecção ocular (Mahmoudi *et al.*, 2018). Encontram-se disponíveis para pesquisa coleções de moléculas aprovadas pelo FDA, neste grupo encontram-se fármacos já comercializados, com ou sem patente, com as mais diversas atividades biológicas (De Cremer *et al.*, 2015).

A estratégia de associação é muito importante, principalmente quando há uma limitada eficácia da monoterapia, como no caso das infecções envolvendo biofilme, que possuem alta recalcitrância (Nett, 2014; Robbins *et al.*, 2016; Fuentefria *et al.*, 2017). Além disso, a seleção cuidadosa e estratégica da associação pode neutralizar a resistência, até mesmo revertê-la, através de um processo denominado inversão de seleção (Calderone *et al.*, 2014; Robbins *et al.*, 2016).

A diversidade da etiologia fúngica e superação dos desafios associados ao desenvolvimento de resistência e potencial recaída terapêutica associada à monoterapia em infecções oftálmicas, parece ter como alternativa a combinação de terapias. A combinação é relatada, pelo menos em casos específicos, com melhor eficácia em comparação com a monoterapia e a determinação *in vitro* destas interações parece informativa (Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019). Assim, a terapia associada antifúngica é geralmente iniciada a fim de sobrepor os desafios da monoterapia (Mahmoudi *et al.*, 2018; Lakhani *et al.*, 2019). No entanto, os dados clínicos ainda permanecem escassos a este respeito, devido à rápida substituição e/ou substituição de 1 medicamento antifúngico para outro em casos de desenvolvimento de resistência e/ou recaída em infecções fúngicas oculares (Lakhani *et al.*, 2019). A associação de terapias para aumentar a eficácia do agente antifúngico através da administração simultânea também requer um estudo cuidadoso, uma vez que há o risco de antagonismo nesta associação (Thomas, 2003 B). Além disso, embora a evidência clínica para a

superioridade da terapia associada frente à monoterapia esteja disponível, é importante ressaltar que a eficácia de diferentes associações pode ser diferente para cada paciente/fungo (Mahmoudi *et al.*, 2018). Em casos de ceratites fúngicas clinicamente resistentes, bem como em casos por patógenos incomuns, a determinação *in vitro* do perfil de suscetibilidade ou da eficácia das associações pode fornecer dados úteis de grande relevância (Mahmoudi *et al.*, 2018).

Além disso, nos últimos anos, os pesquisadores se concentraram no estudo de associações *in vitro* de agentes antifúngicos para encontrar as associações úteis em casos relacionados a fungos resistentes (Mahmoudi *et al.*, 2018). *In vitro*, as associações demonstraram bons resultados (Lakhani *et al.*, 2019). A atividade seletiva dos antifúngicos polienos e azóis é um dos principais desafios associados à sua monoterapia (Lakhani *et al.*, 2019). Dessa forma, tem-se usado associações na prática clínica. A natamicina tem sido usada em associação com outras opções de tratamento na terapia de esclerite, conjuntivite e endoftalmite fúngicas (Kaur e Kakkar, 2010). No tratamento de ceratite fúngica complicada, um regime de combinação de agentes antifúngicos é iniciado usando natamicina concomitantemente com miconazol, itraconazol, cetoconazol ou fluconazol (usados *off-label*) (Lakhani *et al.*, 2019).

4.1.1.5. NOVAS ESTRATÉGIAS PREVENTIVAS DE INFECÇÃO

Além das estratégias de tratamento curativo, temos a questão das estratégias preventivas que também são muito importantes, visto a gravidade que estas infecções podem apresentar. Os fungos são responsáveis por até 50% dos casos de ceratite ulcerativa, a qual está associada a inúmeros fatores de risco, dentre os quais, inclui-se cirurgia ocular, como a ceratoplastia (Słowik *et al.*, 2015). Ao longo da última década, houve aumento no número de procedimentos realizados, com projeções futuras de continuidade desse aumento. Estima-se o envelhecimento da população e um resultado direto desse crescimento será o aumento dos procedimentos de transplante de córnea (Kiatos *et al.*, 2017). O transplante de córnea é o transplante mais realizado no Brasil e em números, os

dados tornam-se ainda mais significativos. Segundo a ABTO, entre janeiro e março de 2023 foram realizados 3673 transplantes de córnea no Brasil, em setembro de 2023 a fila de espera chega a 22757 pacientes ativos (Registro Brasileiro de Transplantes). Enquanto em 2019, entre janeiro e setembro de 2018 foram realizados 11321 transplantes de córnea e, neste período, 12207 pessoas ingressaram na lista de espera pela cirurgia (Registro Brasileiro de Transplantes).

Como em todos os tipos de cirurgia, existe o risco de complicações decorrentes de um transplante de córnea. Estes podem incluir a rejeição da nova córnea pelo corpo, problemas de visão e o risco de infecção pós-transplante (nhs.uk). Embora o transplante de córnea seja um procedimento altamente bem sucedido e, ainda que incomum, a ceratite infecciosa é uma complicação muito séria, que pode evoluir, ocasionando o acometimento de toda estrutura ocular (endoftalmite), comprometendo seriamente a visão do paciente (Davila e Mian, 2016). Os fatores de risco relacionados a complicação infecciosa pós-transplante podem estar associados ao receptor (uso de corticoides, lentes de contato, olho seco, cicatrizes nas mucosas), à técnica cirúrgica (ceratoplastia lamelar ou ceratoplastia penetrante tradicional) ou ao tecido do doador (Davila e Mian, 2016). O fator de risco mais importante é o tecido doador contaminado, que se encontra associado ao método de conservação do material e o tempo decorrido entre o óbito do doador e a remoção para condicionamento em meio de preservação (Davila e Mian, 2016). Medidas preventivas, como a vigilância da aquisição, o processamento e o armazenamento do tecido da córnea são vitais (Davila e Mian, 2016).

4.1.1.5.1. TRANSPLANTE DE CÓRNEA E MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

Um transplante de córnea (ceratoplastia) é uma operação para remover toda ou parte de uma córnea danificada e substituí-la por tecido doador saudável (nhs.uk). O transplante de córnea ou ceratoplastia é o transplante mais comumente realizado em todo o mundo (Singh *et al.*, 2019). O primeiro transplante de córnea foi realizado em 1886, substituindo a córnea doente

humana pela córnea de coelho (Singh *et al.*, 2019). O primeiro transplante de espessura total de córnea humana bem sucedido foi realizado em 1905. O doador era um menino de 11 anos, submetido a uma enucleação terapêutica. O tecido foi mantido em soro fisiológico morno e a operação de transplante iniciada em seguida (Armitage, 2011). Foi a partir da década de 1930 que córneas de doadores humanos falecidos passaram a ser utilizadas, com remoção do globo ocular e armazenamento em potes de vidro (câmaras úmidas) no gelo por vários dias. Dessa forma, estabeleceu-se o primeiro banco de olhos do mundo, na década de 1940 em Nova York. A partir de então, houveram inúmeros avanços nas técnicas de remoção e preservação da córnea, bem como o incentivo à doação, resultando em aproximadamente 40.000 transplantes de córnea por ano no EUA (Armitage, 2011). Desde então, o transplante córnea evoluiu, com técnicas de substituição da córnea de espessura total ou a substituição apenas de camadas da córnea com injúria tecidual. O banco de olhos desempenha um papel importante em todo o processo de recuperação, armazenamento e transplante (Singh *et al.*, 2019).

A córnea usada em um transplante é removida do olho saudável de uma pessoa que morreu e doou sua córnea. As córneas são rigorosamente verificadas quanto a doenças e infecções antes de serem transplantadas (nhs.uk). Há critérios de qualidade e segurança de aloenxertos de tecido definidos por agências reguladoras. Os critérios de seleção para doadores de córnea são até certo ponto menos restritivos do que para os tecidos vascularizados, no entanto, também visam minimizar o risco de transmissão de doenças dos doadores para os receptores da córnea. Além disso, a qualidade deste tecido é importante, uma vez que a maioria dos transplantes de córnea requer enxertos com endotélio viável (Armitage, 2011).

O tipo de transplante de córnea dependerá de qual parte da córnea está danificada ou de quanto da córnea precisa ser substituída. A maioria dos transplantes de córnea faz a substituição de toda a espessura da córnea. Contudo, em alguns casos é possível realizar o transplante de apenas uma parte da córnea (nhs.uk). A substituição seletiva de apenas uma parte da córnea que está

comprometida tem muitas vantagens em termos de menos complicações intraoperatórias, mantém a integridade do globo ocular e menores chances de rejeição do tecido transplantado no pós-operatório (Singh *et al.*, 2019).

Ceratoplastia penetrante - é o transplante de espessura total. Neste procedimento, há a remoção de toda a córnea comprometida no centro do olho, é realizado um recorte circular, que será substituído pelo tecido corneano do doador. Este tecido mantém-se no local pela realização de suturas, formando um aspecto de “estrela” nas bordas deste tecido (nhs.uk). Já o transplante de espessura parcial, permite a substituição apenas das partes da córnea com inúria tecidual. O tempo de recuperação é mais rápido e há menor risco de complicações (nhs.uk). Ainda, de acordo com a porção a ser transplantada, há a classificação deste procedimento, em relação ao transplante da porção frontal da córnea, dentre as principais técnicas (nhs.uk; Singh *et al.*, 2019):

Ceratoplastia Lamelar Anterior - remove e substitui apenas as camadas externas (frontais) da córnea. O tecido saudável de um doador substitui a porção removida e, assim como ocorre com uma ceratoplastia penetrante, suturas são usadas para fixar o tecido doado no lugar (nhs.uk; Singh *et al.*, 2019): i) ceratoplastia lamelar anterior superficial substitui apenas as camadas frontais da córnea, deixando intacto o estroma e o endotélio saudáveis (nhs.uk; Singh *et al.*, 2019); ii) ceratoplastia lamelar anterior profunda remove e substitui as camadas externa e média da córnea, deixando as camadas internas intactas (nhs.uk; Singh *et al.*, 2019).

Ceratoplastia endotelial - procedimentos que substituem o tecido danificado das camadas posteriores da córnea, incluindo o endotélio e a membrana de Descemet (nhs.uk; Singh *et al.*, 2019): i) ceratoplastia endotelial de Descemet – substitui o revestimento interno da córnea juntamente com cerca de 20% do estroma, usa o tecido doador para substituir cerca de um terço da córnea (nhs.uk; Singh *et al.*, 2019); ii) ceratoplastia endotelial da membrana de Descemet – substitui apenas a camada interna de células da córnea, usa uma camada muito mais fina de tecido doador, extremamente fino e frágil. O tecido

doado é mantido no lugar usando uma bolha de ar temporária (nhs.uk; Singh *et al.*, 2019).

Ceratoplastia Lamelar Posterior - substitui o endotélio e trata as condições em que apenas o endotélio (camada mais posterior da córnea) está com injúria, o restante da córnea não é afetado (Singh *et al.*, 2019). Ainda, vários avanços nas técnicas evoluíram que ajudam a melhorar os resultados da ceratoplastia, dos quais a tomografia de coerência óptica intraoperatória e o laser de femtossegundo são os mais importantes, além dos avanços em bioengenharia (Singh *et al.*, 2019).

A integridade do epitélio corneano doador é essencial para a sobrevivência do enxerto após a ceratoplastia penetrante (Greenbaum *et al.*, 2004). Dessa forma, muita atenção deve ser dada ao seu destino durante seu armazenamento para transplante (Greenbaum *et al.*, 2004). Existem três abordagens principais para a preservação e realização do armazenamento do tecido corneano contendo células vivas: cultura, hipotermia e criopreservação (Armitage, 2011).

As técnicas de criopreservação da córnea foram desenvolvidas e aplicadas clinicamente na década de 60. Oferece a perspectiva de tempo de armazenamento ilimitado, porém a complexidade e o potencial de dano ao endotélio levam a uma baixa utilização na rotina de bancos de olhos (Armitage, 2011). Embora permita manter o tecido vivo por um período muito longo, é uma técnica que exige profissionais altamente treinados e em uma logística finamente organizada, além de ser laborioso. Alguns bancos de olhos a utilizaram com sucesso até o final da década de 1980, com a generalização do uso de meios de armazenamento de médio prazo (Faria e Sousa e Barretto, 2017).

A cultura de órgãos foi introduzida em meados de 1980, no Reino Unido, e ocasionou grande impacto na logística de fornecimento de córneas para hospitais de todo o país. Esta técnica permitiu que o tempo de armazenamento de apenas dois a quatro dias (olhos ou córneas em meio M-K) pudesse se estender a até quatro semanas (Armitage, 2011). Nesta técnica, o botão corneocleral é

armazenado em meio líquido durante quatro semanas, em temperaturas de 31°C a 37°C ou mesmo temperatura ambiente (Faria e Sousa e Barretto, 2017). Possui a vantagem de aumentar a chance de detecção de bactérias e fungos, agentes potenciais de infecções, além disso, há o aumento da eficácia dos antibacterianos presentes no meio de cultura devido à temperatura de armazenamento. Ainda, é realizada a análise de uma amostra após sete dias, com o objetivo de detectar fungos e bactérias, bem como uma triagem microbiológica adicional pouco antes da emissão do tecido para o transplante (Armitage, 2011). Outra vantagem é a retenção da capacidade de cicatrização *in vitro* da camada endotelial, por hipertrofia celular e deslizamento, além da possibilidade de revigorar o endotélio da córnea (Faria e Sousa e Barretto, 2017). Em contrapartida, consome mais tempo e é mais laboriosa em relação ao armazenamento a frio, ainda, necessita de uma técnica invasiva para análise endotelial (Faria e Sousa e Barretto, 2017). Há perda de células pela ocorrência de apoptose tecidual, que parece afetar mais as células epiteliais do que as endoteliais (Armitage, 2011). Ainda possuem a problemática de que as células endoteliais tendem a consumir os agentes hiperosmóticos, eventualmente se tornando tóxicos para o tecido. No entanto, a ausência destes componentes, que acabam não sendo utilizados periodicamente, é que as córneas preservadas adquirem duas vezes a espessura normal. Como forma de contrabalançar, o botão corneocleral é mergulhado em um meio de transporte suplementado com dextrano 4-8% imediatamente antes de seu envio para o procedimento. Logo, há a dependência de um meio de transporte (Faria e Sousa e Barretto, 2017). Assim, o custo tende a ser maior com necessidade de estrutura e profissionais altamente especializados (Faria e Sousa e Barretto, 2017). O uso de cultura de órgãos a 28–37 °C para armazenamento de córneas na maioria dos bancos de olhos europeus ocorre devido ao tempo de armazenamento quando comparado ao armazenamento hipotérmico (Armitage, 2011).

Os bancos de olhos na América do Norte usam, principalmente, armazenamento hipotérmico devido à sua percepção de simplicidade e eficácia (Armitage, 2011). O armazenamento hipotérmico (2–8 °C) é o método mais amplamente utilizado mundialmente. A baixa temperatura reduz o metabolismo

celular, dessa forma, a demanda por energia, ainda assim, o frio ocasiona efeitos deletérios nas células. O armazenamento hipotérmico tornou-se o método de escolha na década de 1970, quando houve a introdução do meio de preservação McCarey-Kaufman (meio M-K), um meio de cultura de tecidos 199 (M-199) contendo 5% de dextrano, sulfato de condroitina, precursores de ATP, penicilina e estreptomicina. Este meio permitiu o armazenamento do tecido a 4 °C por quatro dias, o que ocasionou um grande impacto na logística dos transplantes (Armitage, 2011; Faria e Sousa e Barretto, 2017). O desenvolvimento de soluções como Optisol-GS estendeu ainda mais os tempos de armazenamento hipotérmicos, sendo amplamente utilizado em bancos de olhos dos EUA (Armitage, 2011). Se destaca por seu uso generalizado, preservando as córneas por até 14 dias a 4°C, boa preservação da morfologia celular e manutenção da espessura original da córnea (Faria e Sousa e Barretto, 2017). Embora as formulações destes produtos seja geralmente protegida por segredos industriais, de acordo com Faria e Sousa e Barretto (2017) os constituintes básicos dos meios de armazenamento líquidos para preservação a frio são os seguintes:

- meio de cultura de células, que são soluções salinas balanceadas com nutrientes celulares, aminoácidos, vitaminas, carboidratos e cofatores, componentes que mantêm a vitalidade das células e tecidos. Dentre os mais utilizados temos TC-199, MEM ou a combinação de ambos com a solução de Earle;

- solução tampão, que são soluções aquosas de ácidos fracos com suas bases conjugadas, que mantêm o pH em torno de 7,4. Os mais populares em bancos de olhos são o tampão de bicarbonato e o HEPES;

- agentes hiperosmóticos, que reduzem o edema do tecido associado à preservação do meio líquido. É uma consequência direta do declínio geral da atividade metabólica celular corneana pós-morte, particularmente células endoteliais. Os agentes hiperosmóticos utilizados na preservação a frio são o sulfato de condroitina, que tem o efeito adicional de proteger as células endoteliais, quando em baixa temperatura e concentração certa, e o dextrano,

mais eficiente apesar de ser mais tóxico para o endotélio em concentrações iguais ou superiores a 5%. Os meios de armazenamento mais atuais utilizam a associação de ambos em concentrações menores do que a concentração de uso individual, de forma a promover a desidratação satisfatória e segura para o endotélio;

- indicador de pH, o mais utilizado é o vermelho fenol, que dá ao meio uma coloração rosada em pH 7,4. Quando acima deste valor, torna-se vermelho e abaixo dele, amarelo. Quando amarelo, sugere contaminação microbiana do meio;

- antibacterianos, são a defesa final contra a colonização bacteriana no botão corneoescleral. Inicialmente era usada a penicilina com estreptomicina. Atualmente usa-se gentamicina com estreptomicina, com dose usual de 80-100 µg/mL;

- aditivos, são substâncias adicionadas ao meio líquido objetivando contrabalançar efeitos deletérios provenientes da temperatura fria e do tempo de preservação. Aqui são inclusos: antioxidantes, como glutatona; estabilizadores de colégenio, tais como L-hidroxi prolina; precursores de adenosina trifosfato (do inglês ATP), como adenina, adenosina e inosina; fontes de energia, como o piruvato de sódio; vitaminas como ácido ascórbico, calciferol, niacina; e micronutrientes.

Três questões são relevantes na escolha do meio: disponibilidade local, custo e período de armazenamento (Faria e Sousa e Barretto, 2017). Atualmente, no Brasil, são utilizados dois meios de preservação hipotérmicos: Optisol-GS[®] (Bausch+Lomb, Rochester, Nova Iorque, EUA) (contendo gentamicina-estreptomicina) e o Eusol-C[®] (AL.CHI.MI.A. Srl, Ponte San Nicolò, Padova, Itália) (contendo gentamicina), ambos importados. São usados, por até 14 dias, para manter a viabilidade endotelial da córnea, espessura, transparência do enxerto e acuidade visual pós-transplante. A presença dos antibacterianos é usada para prevenção de complicações bacterianas pós-transplante, no entanto, não há adição de antifúngicos (Pereira, 2011). Embora sejam seguidas inúmeras

legislações e protocolos rigorosos para seleção de doadores e para remoção do tecido corneano, com uso de colírios antimicrobianos, patógenos bacterianos ainda são associados a esta fonte de infecção. No entanto, estudos acerca destes meios constataram que a maior parte da contaminação presente é fúngica (62%) (Arbelaez *et al.*, 2015; Davila e Mian, 2016) (FIGURA 12).

Diante destes dados, a problemática acerca de contaminações fúngicas em tecidos oculares se estende além das complicações pós-operatórias. É de extrema relevância que se considere o fato de que as contaminações microbiológicas podem levar ao descarte do tecido corneano, impactando na disponibilidade de tecido e assim na fila de espera para transplante. Em 2016 a estimativa mundial de transplantes de córneas era de que a cada córnea captada haviam 70 pacientes em fila de espera, o que se agravou a partir da pandemia de Covid-19, pela dificuldade de compra dos insumos necessários em todo este processo, mas principalmente em relação à disponibilidade de tecido (Gain *et al.*, 2016; Rodella *et al.*, 2022). Outra questão de suma relevância que sofre grande influência das contaminações microbiológicas no tecido doador é o impacto financeiro (Krajina *et al.*, 2022; Pregão N° 00010/2023). Sem considerar os dados acerca de deslocamento de equipe e insumos necessários para captação do tecido, apenas considerando o custo referente ao meio de preservação utilizado, podemos ter uma dimensão inicial dos custos envolvidos. Um frasco de meio de preservação Optisol-GS® é comprado pelos centros de serviço de oftalmologia por um valor de cerca de R\$ 1250,00, já o meio Eusol-C® é adquirido por um valor de cerca de R\$ 890,00 (Pregão N° 00010/2023). Desta forma, há a necessidade do desenvolvimento de um meio de preservação que seja atóxico e não irritante para a mucosa ocular, com espectro de ação antimicrobiano mais amplo em relação aos convencionais (incluindo patógenos fúngicos) a fim de mitigar estes problemas.



Figura 12. Halos córneo-esclerais em meio de preservação apresentando crescimento fúngico (Fonte: Autora).

4.1.2. COVID-19 E TRANSPLANTES DE CÓRNEA

A pandemia sem precedentes de Covid-19, vivida a partir de 2020, testemunhou a suspensão dos procedimentos de remoção de córnea do doador. O impacto desta ação tem como provável desfecho um aumento na lacuna existente entre a demanda e a oferta de córnea, de forma global e imprevisível (Chaurasia *et al.*, 2020). Nesta nova fase do mundo pós-Covid-19, é necessário o planejamento e implementação de estratégias que visem evitar uma crise de escassez de córneas, uma vez que alguns casos exijam o procedimento em curto prazo (Chaurasia *et al.*, 2020). Logo, a adoção de métodos de preservação de longo prazo devem ser considerados pelos bancos de olhos, a nível mundial, como forma de gerenciar as incertezas na disponibilidade de doadores córneas e uso emergencial (Chaurasia *et al.*, 2020).

5. MANUSCRITOS

O objetivo geral do presente trabalho é o desenvolvimento de um novo meio de preservação de córneas para transplante, com espectro de atividade mais amplo em relação aos já existentes, abrangendo a ação antifúngica.

Como forma de atingir o objetivo final do trabalho, os manuscritos apresentados a seguir contemplam os objetivos específicos descritos abaixo:

a. Determinar o perfil de atividade antifúngica de cinco compostos (três agentes antifúngicos comerciais e dois potenciais agentes antifúngicos derivados de 8-hidroxiquinolina): natamicina, anfotericina B, voriconazol, clioquinol e PH151 frente a cepas (algumas de origem de infecções oculares) dos principais gêneros fúngicos associados às infecções oftálmicas: *Fusarium* e *Candida*;

b. Avaliar a interação entre os cinco compostos em questão em diferentes combinações duplas, triplas e quádruplas frente a cepas dos principais gêneros fúngicos associados às infecções oftálmicas;

c. Determinar a cinética de morte da melhor combinação frente a duas representativas de cada gênero;

d. Determinar o perfil de toxicidade tópico dos compostos isolados e da(s) melhor(es) associação(ões), com o intuito de verificar, *in vitro* e *in silico*, sua segurança;

e. Determinar a capacidade de formação de biofilme das cepas utilizadas e atividade de inibição da formação de biofilme sobre tecido córneo-escleral dos compostos isolados e da(s) melhor(es) associação(ões);

f. Determinar a eficiência de ação microbiológica da melhor combinação em condições de armazenamento do meio de preservação;

g. Avaliar através de Microscopia a adesão fúngica ao tecido da córnea e capacidade da melhor combinação em inibir este processo.

CAPÍTULO I

O CAPÍTULO I é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 119 – 140. Este capítulo avalia a atividade antifúngica e frente aos biofilmes de espécies de *Candida*, formados em placas de microtitulação e em cateter venoso central, de derivados de 8-hidroxiquinolina e quinazolina. Ainda, avalia a aplicabilidade de um hidrogel formador de filme contendo ativo antifúngico sobre a superfície de cateter venoso central.

Reginatto P, Joaquim AR, Rocha DA, Berlitz SJ, Kulkamp-Guerreiro IC, De Andrade SF, Fuentefria AM. 8-hydroxyquinoline and quinazoline derivatives as potential new alternatives to combat *Candida* spp. biofilm. *Lett Appl Microbiol.* 2022 Mar;74(3):395-404. doi: 10.1111/lam.13607. Epub 2021 Dec 14. PMID: 34822194.

CAPÍTULO II

O CAPÍTULO II é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 141 - 197. Este capítulo visa abordar importantes aspectos vinculados às infecções fúngicas oculares: principais formas clínicas e agentes etiológicos, tratamento farmacológico e não farmacológico e a problemática associada. Um compilado de casos clínicos apresenta os aspectos discutidos dentro do contexto da prática clínica.

Reginatto P, Agostinetti GJ, Fuentefria RDN, Marinho DR, Pizzol MD, Fuentefria AM. Eye fungal infections: a mini review. Arch Microbiol. 2023 May 15;205(6):236. doi: 10.1007/s00203-023-03536-6. PMID: 37183227; PMCID: PMC10183313.

CAPÍTULO III

O texto completo do CAPÍTULO III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 199 – 223, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Este capítulo avaliou o perfil de suscetibilidade de cepas dos gêneros *Candida* e *Fusarium* frente a agentes antifúngicos comerciais e um conhecido derivado de 8-hidroxiquinolina, o clioquinol, sozinhos e em diferentes combinações triplas e quádrupla. A melhor combinação foi avaliada quanto a sua cinética de morte e toxicidade *in vitro*.

CAPÍTULO IV

O texto completo do CAPÍTULO IV, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 225 – 253, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Este capítulo avaliou o perfil de suscetibilidade de cepas dos gêneros *Candida* e *Fusarium* frente a agentes antifúngicos comerciais e um novo derivado de 8-hidroxiquinolina, o PH151, sozinhos e em diferentes combinações, duplas e triplas. A melhor combinação foi avaliada quanto a sua toxicidade *in vitro* e *in silico*.

CAPÍTULO V

O texto completo do CAPÍTULO V, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 255 – 280, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Este capítulo avaliou a formação de biofilme das cepas dos gêneros *Candida* e *Fusarium* em placa de microtitulação, a capacidade dos agentes antifúngicos, sozinhos e em combinação, de impedir a adesão dos microrganismos sobre tecidos córneo-esclerais, a efetividade da melhor combinação sob condições de armazenamento de córneas para transplante e visualização por microscopia eletrônica de varredura da ação da combinação sobre os microrganismos quando em contato com a córnea.

6. DISCUSSÃO GERAL

O texto completo deste item, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 281 – 295, foi suprimido por tratar-se de discussão de resultados publicados ou em preparação para publicação em periódico científico.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As infecções fúngicas oculares são patologias extensamente problemáticas, devido a isso, estão associadas a altas taxas de morbidade, de leve à grave. Existem inúmeros problemas associados, do diagnóstico, identificação, manejo da infecção até a escolha da terapia. A falha ou a demora em cada etapa está intimamente relacionada a um desfecho negativo para o paciente. Ainda, temos a questão do arsenal terapêutico antifúngico, que é limitado, devido às poucas opções comercialmente disponíveis, além das diversas deficiências associadas, como a penetração no tecido ocular, perfil de toxicidade, resistência microbiana e espectro de atividade, que acabam por limitar ainda mais este arsenal. Cabe ressaltar acerca do limitado arsenal terapêutico disponível para o manejo dessas patologias, a ausência de terapia farmacológica padrão e o amplo uso de natamicina, anfotericina B e voriconazol. Ainda, podemos observar que todas as etapas envolvidas no processo destas infecções, como um todo, até o desfecho final, encontram-se intimamente e importantemente relacionadas. O conhecimento amplo dos aspectos que estão envolvidos nas infecções fúngicas oculares, em todo seu contexto, é necessário para que o desfecho final do paciente seja positivo e minimamente danoso.

Os derivados de quinazolina (PH100) e de 8-hidroxiquinolina (PH157) testados mostraram um perfil de atividade promissor, uma vez que ambos os compostos foram ativos contra as cepas de *Candida* spp., embora a atividade frente à biofilmes formados em placas de microtitulação tenha ficado, no geral, abaixo de 90%. A adição do derivado PH157 a uma formulação manteve seu perfil antifúngico. A formulação apresenta inúmeras características vantajosas, facilita a aplicação do composto sobre superfícies, é de simples preparo e baixo custo. Devido ao potencial antifúngico, planctônico e séssil, estes derivados podem representar importantes alternativas como ativos antifúngicos. No entanto, diante dos resultados obtidos para CLQ e PH151, estes apresentaram atividade antifúngica superior quando comparados aos derivados inicialmente testados (PH100 e PH157). Não obstante, estes perfis de atividade antifúngica

foram comparáveis aos de agentes antifúngicos comerciais já utilizados na clínica oftalmológica, como VRC, AMB e NAT. Inclusive, apresentando resultados significativamente superiores frente algumas cepas fúngicas. Além disso, as diferentes combinações duplas, triplas e quádrupla testadas não apresentaram efeito antagônico, ou seja, a combinação dos compostos não acarreta prejuízo da ação de um sobre a ação dos demais, podendo apresentar em alguns casos, potencialização desta atividade antifúngica (efeito sinérgico). Destacando a combinação VRC-AMB-CLQ, que apresentou maior percentual de sinergismo sobre as cepas e ação fungicida tempo-dependente.

Ainda, cabe destacar a alta eficácia antibiofilme dos agentes antifúngicos sozinhos e combinados frente às diversas cepas de *Candida* e *Fusarium* testadas sobre tecidos de halos córneo-esclerais, mesmo quando desafiadas frente a cepas de alta capacidade de formação de biofilme. Devido aos excelentes resultados que as combinações VRC-AMB-CLQ e VRC-AMB-PH151 apresentaram, a combinação VRC-AMB-CLQ foi selecionada para dar continuidade ao trabalho. A avaliação da sua eficácia demonstrou sua capacidade de diminuir a contagem de células ao longo do período de avaliação de 14 dias, com perfil de ação fungicida frente a ambos os gêneros fúngicos testados. Logo, a potencial utilização desta combinação como aditivo em meios de preservação de tecidos corneanos tem grande relevância e impacto no âmbito de saúde pública. Surge como uma alternativa para mitigar a probabilidade de complicações infecciosas após ceratoplastia, muitas vezes ligada a desfechos com diferentes graus de deficiência visual. Além disso, essa abordagem assume um papel crucial como estratégia para amenizar a perda de tecido do doador, inicialmente elegível para transplante, mas que poderia ser descartado devido à presença de contaminação microbiológica.

A avaliação do perfil de toxicidade *in vitro/in silico*, dos agentes antifúngicos e das combinações VRC-AMB-CLQ e VRC-AMB-PH151, indicou baixa toxicidade tópica. Logo, representam alternativas como potenciais ativos em formulações tópicas oculares, incluindo os meios de preservação de córneas

para transplantes. Destacando a combinação VRC-AMB-CLQ, com excelente potencial antifúngico, candidato a avançar nos estudos como ativo para combate das infecções oculares.

Como perspectivas deste trabalho, temos alguns pontos a serem avaliados, é muito importante conhecer e avaliar também o perfil de toxicidade dos compostos a nível sistêmico, para verificar sua potencialidade de uso na terapia de infecções oculares ou mesmo a capacidade de penetração através da córnea, para uso na forma tópica, como colírio. Ainda, é de suma importância ampliar o perfil de ação antifúngica, frente a outros gêneros fúngicos, como *Aspergillus* e alguns fungos demáceos, bem como outros microrganismos de importância em infecções oculares, como espécies de *Acanthamoeba*.

8. REFERÊNCIAS

- Abbondante S, Leal SM, Clark HL, Ratitong B, Sun Y, Ma LJ, Pearlman E. 2023. Immunity to pathogenic fungi in the eye. *Semin Immunol.* 67: 101753. DOI: 10.1016/j.smim.2023.101753
- Acuña M, Farfán F, Cofré F, Benadof D. 2016. Mediastinitis por *Aspergillus fumigatus* en un paciente pediátrico inmunocompetente posterior a una cardiocirugía. *Revista Chilena de Infectología*, 33(1): 75–78. DOI:10.4067/s0716-10182016000100013
- Ahmadikia K, Aghaei GS, Fallah B, Naeimi EM, Malekifar P, Rahsepar S, Getso MI, Sharma S, Mahmoudi S. 2021. Distribution, Prevalence, and Causative Agents of Fungal Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (1990 to 2020). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 26(11). DOI: 10.3389/fcimb.2021.698780
- Ajani OO, Aderohunmu DV, Umeokoro EN, Olomieja AO. 2016. Quinazoline pharmacophore in therapeutic medicine. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11:716-733. DOI: 10.3329/bjp.v11i3.25731
- Amphornphruet A, Silpa-archa S, Preble JM, Foster CS. 2017. Endogenous Cryptococcal Endophthalmitis in Immunocompetent Host: Case Report and Review of Multimodal Imaging Findings and Treatment. *Ocular Immunology and Inflammation*, 1-5. DOI:10.1080/09273948.2017.1298820
- Andrés JLB, López-Soria LM, Izquierdo AA, Ecenarro JE, Lera RF, Fierro JG, Nuñez FJC, Blasco AC. 2018. Endophthalmitis caused by *Fusarium*: An emerging problem in patients with corneal trauma. A case series. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35(2): 92-96. DOI: 10.1016/j.riam.2017.09.007
- Arbelaez JG, Feng MT, Pena TJ, Price MO, Price FW. 2015. A year of cornea in Review: 2013. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 4(1): 40-50. DOI: 10.1097/APO.0000000000000110

Arinelli A, Aleixo ALQdoC, Freitas DFS, do Valle ACF, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Curi ALL. 2019. Ocular Sporotrichosis: 26 Cases with Bulbar Involvement in a Hyperendemic Area of Zoonotic Transmission. *Ocular Immunology and Inflammation*, 1–8. DOI: 10.1080/09273948.2019.1624779

Armitage WJ. 2011. Preservation of Human Cornea. *Transfus Med Hemother*, 38(2): 143-147. DOI: 10.1159/000326632

Armstrong RA. 2000. The microbiology of the eye. *Ophthalmic Physiol Opt*, 20(6): 429-441.

Austin A, Lietman T, Rose-Nussbaumer J. 2017. Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*. 124: 1678-1689.

Baharani A, Reddy AK, Reddy PRR. 2019. *Aspergillus flavus* Necrotising Scleritis following *Pars Plana* Vitrectomy. *Ocular Immunology and Inflammation*, 1–3. DOI: 10.1080/09273948.2019.1625414

Bareggi SR, Cornelli U. 2010. Clioquinol: review of its mechanisms of action and clinical uses in neurodegenerative disorders. *CNS Neurosci Ther*. 18(1): 41-46. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2010.00231.x

Batista BG, Chaves MAde, Reginatto P, Saraiva OJ, Fuentefria AM. 2020. Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53: 1-7. doi: 10.1590/0037-8682-0013-2020

Bergamo VZ, Donato RK, Dalla Lana DF, Donato KJ, Ortega GG, Schrekker HS, Fuentefria AM. 2015. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. *Lett Appl Microbiol*. 60(1): 66-71. DOI: 10.1111/lam.12338

Bicas H. 1997. Morfologia do sistema visual. *Medicina, Ribeirão Preto*, 30: 7-15,

Boscariol JCC, Corrêa GO, Camacho DP. 2012. *Candida* spp. isolated of the buccal cavity and of dental prosthesis of seniors. *Faculdade Ingá/UNINGÁ*.

- Bouza E, Guinea J, Guembe M. 2015. The role of antifungals against *Candida* biofilm in catheter-related candidemia. *Antibiotics*, 4: 1-17. DOI: 10.3390/antibiotics4010001
- Brandt ME, Warnock DW. 2003. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemother*, 2: 36-47. DOI: 10.1179/joc.2003.15
- Buchta V, Feuermannová A, Váša M, Bašková L, Kutová R, Kubátová A, Vejsová M. 2014. Outbreak of fungal endophthalmitis due to *Fusarium oxysporum* following cataract surgery. *Mycopathologia*, 177(1-2): 115–121. DOI:10.1007/s11046-013-9721-5
- Bujdáková H. 2016. Management of *Candida* biofilms – state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiology*, 11(2): 235-251. DOI: 10.2217/fmb.15.139
- Calderone R, Sun N, Gay-Andrieu F, Groutas W, Weerawarna P, Prasad S, Alex D, Li D. 2014. Antifungal drug discovery: the process and outcomes. *Future Microbiology*, 9(6): 791-805. DOI: 10.2217/fmb.14.32
- Calvillo-Medina RP, Reyes-Grajeda JP, Barba-Escoto L, Bautista-Hernandez LA, Campos-Guillén J, Jones GH, Bautista-de Lucio VM. 2019. Proteome analysis of biofilm produced by a *Fusarium falciforme* keratitis infectious agent. *Microb Pathog*. 130: 232-241. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.03.001
- Capote-Bonato F, Sakita KM, de Oliveira AG, Bonfim-Mendonça Pde S, Crivellenti L Z, Negri M, Svidzinski TIE. 2018. *In vitro* interaction of *Candida tropicalis* biofilm formed on catheter with human cells. *Microbial Pathogenesis*, 125: 177-182. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.09.029.
- Cavalheiro M, Teixeira MC. 2018. *Candida* Biofilms: threats, challenges and promising strategies. *Frontiers in Medicine*. 5: 28. DOI: 10.3389/fmed.2018.00028

Chacon-Cruz E, Male-Valle F, Rivas-Landeros RM, Lopatynsky-Reyes EZ, Almada-Salazar LA, Becka CM. 2018. Severe mycotic keratoconjunctivitis caused by *Fusarium* sp. in an immunocompetent child successfully treated with intravenous voriconazole and keratoplasty: case report and short review of the literature. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 12(6): 2049936118811213. DOI: 10.1177/2049936118811213

Chakrabarti A, Shivaprakash MR, Singh R, Tarai B, George VK, Fomda BA, Gupta A. 2008. Fungal Endophthalmitis. *Retina*, 28(10): 1400–1407. DOI:10.1097/iae.0b013e318185e943

Chandra J, Mukherjee PK. 2015. *Candida* biofilms: development, architecture and resistance. *Microbiol Spectrum*, 3(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015

Chang YL, Yu SJ, Heitman J, Wellington M, Chen YL. 2017. New facets of antifungal therapy. *Virulence*, 8(2): 222–236. DOI: 10.1080/21505594.2016.1257457

Chaurasia S, Das S, Roy A. 2020. A review of long-term corneal preservation techniques: Relevance and renewed interests in the COVID-19 era. *Indian J Ophthalmol*. 68(7): 1357-1363. DOI: 10.4103/ijjo.IJO_1505_20

Cheng SC-H, Lin Y-Y, Kuo C-N, Lai L-J. 2015. *Cladosporium* keratitis – a case report and literature review. *BMC Ophthalmology*, 15(1). DOI:10.1186/s12886-015-0092-1

Chiu Y-H, Hsiao H-H, Du J-S. 2021. A rare patient with primary endogenous *Aspergillus* endophthalmitis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(3): 538–539. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.12.014

Cleveland Clinic Disponível em: my.clevelandclinic.org (Acesso em 28 de maio de 2022).

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard 3rd ed.. CLSI Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EUA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi; Approved Standard 2nd ed.. CLSI Document M38-A2. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

Córdoba A, Graue-Hernandez EO, Bermudez-Magner JA, Ramirez-Miranda A, Irusteta L, de Lucio VMB, Ponce-Angulo DG, Bautista-Hernandez LA, Navas A. 2019. Corneal Biofilm Plaques: A Novel Clinical Presentation. *Cornea*. 38(6): 764-767. DOI: 10.1097/ico.0000000000001923

Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Pitangui NS, de Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, Medina-Alarcón KP, Melo WCMA, Marcelino MY, Braz JD, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. 2017. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *Journal Fungi*, 3(2). DOI: 10.3390/jof3020022

Cui J, Ren B, Tong Y, Dai H, Zhang L. 2015. Synergistic combinations of antifungals and antivirulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*, 6(4): 362-371. DOI: 10.1080/21505594.2015.1039885

Cunningham C, Raiji V. 2016. Endophthalmitis. *Disease-a-Month*, 63(2): 45-48. DOI: 10.1016/j.disamonth.2016.09.005

Czakó C, Sándor G, Popper-Sachetti A, Horváth H, Kovács I, Imre L, Jeannette T, Péter B, Zsolt NZ, Gyula S, Szentmáry N. 2019. Fusarium és Sarocladium okozta fertőzések szemészeti vonatkozásai és azok kezelése. *Orvosi Hetilap*, 160(1): 2–11. DOI:10.1556/650.2019.31259

da Costa B, Pippi B, Andrzejewski Kaminski TF, Andrade SF, Fuentefria AM. 2020. *In vitro* antidermatophytic synergism of double and triple combination of

clioquinol with ciclopirox and terbinafine. *Mycoses*, 63(9): 993-1001. DOI: 10.1111/myc.13127

Dabas Y, Bakhshi S, Xess I. 2015. Fatal Cases of Bloodstream Infection by *Fusarium solani* and Review of Published Literature. *Mycopathologia*, 181(3-4): 291-296. DOI: 10.1007/s11046-015-9960-8

Dal Pizzol M, Freitas EC, Locatelli C, Guareze F, Reginatto P, Machado G, Fuentefria A, Marinho D. 2021. Antifungal Efficacy and Safety of Cycloheximide as a Supplement in Optisol-GS. *Drug Des Devel Ther.* 18;15: 2091-2098. doi: 10.2147/DDDT.S298059

Davila JR, Mian SI. 2016. Infectious keratitis after keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol*, 27(4): 358–366. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000269

de Chaves MA, do Amaral TF, Coutinho NMdaSR, Kaminski TFA, Teixeira ML, de Oliveira LFS, de Andrade SF, Fuentefria AM. 2020. Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. 63:1069–1082. DOI: 10.1111/myc.13142

De Cremer K, Staes I, Delattin N, Cammue BP, Thevissen K, De Brucker K. 2015. Combinatorial drug approaches to tackle *Candida albicans* biofilms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(8): 973-984. DOI: 10.1586/14787210.2015.1056162

de Oliveira DS. 1986. Interação Medicamentosa: Parte II. *Caderno de Farmácia*. 2(2): 97-110.

Debourgogne A, Dorin J, Machouart M. 2016. Emerging infections due to filamentous fungi in humans and animals: only the tip of the iceberg? *Environmental Microbiology Reports*, 8(3): 332–342. DOI: 10.1111/1758-2229.12404

Duncan K, Parker J, Hoover C, Lindquist TD, Jeng BH. 2018. Efficacy of Amphotericin B against *Fusarium* and *Aspergillus* in corneal storage medium.

Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice, 44(6): 390–392. DOI: 10.1097/icl.0000000000000410

Durand ML. 2013. Endophthalmitis. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(3): 227–234. DOI: 10.1111/1469-0691.12118

Durand ML. 2017. Bacterial and Fungal Endophthalmitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3): 597–613. doi:10.1128/cmr.00113-16

Eddy M-T, Steinberg J, Richard G, Hassenstein A. 2012. Schwerste kontaktlinsenassoziierte mykotische Keratitis. *Der Ophthalmologe*, 109(11): 1106–1111. DOI: 10.1007/s00347-012-2570-7

Espinosa-Heidmann DG, McMillan BD, Lasala PR, Stanley J, Larzo CR. 2012. *Candida dubliniensis* endophthalmitis: first case in North America. *International Ophthalmology*, 32(1): 41–45. DOI: 10.1007/s10792-011-9499-8

Fieß A, Bauer J, Schindel C, Knuf M, Dithmar S. 2015. Endogener *Candida*-Linsenabszess bei Frühgeborenem. *Der Ophthalmologe*, 113(1): 71–74. DOI: 10.1007/s00347-015-0068-9

Fritsch LN, Dias ALT, Silva NC, Fernandes GJM, Ribeiro FBAO. 2022. Comparative analysis of biofilm formation by *Candida albicans* and *Candida krusei* in different types of contact lenses. *Arq Bras Oftalmol*. 85(3): 235-239. DOI: 10.5935/0004-2749.20220033

Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade SF. 2017. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1): 2-13. doi: 10.1111/lam.12820

Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, Thuret G. 2016. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*. 134(2): 167-73. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776

Garg P, Roy A, Roy S. 2016. Update on fungal keratitis. *Current Opinion in Ophthalmology*, 27(4): 333–339. DOI: 10.1097/icu.0000000000000272

Girardot M, Imbert I. 2016. Novel strategies against *Candida* biofilms: interest of synthetic compounds. *Future Microbiology*, 11(1): 69-79. DOI: 10.2217/fmb.15.118

Giurgola L, Gatto C, Parel J-M, Miller D, D'Amato Tóthová J. 2019. antimycotic efficacy and safety of a new cold corneal storage medium by time-kill and toxicity studies. *Cornea*, 38(10): 1314-1321. DOI: 10.1097/ico.0000000000002068

Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI) <<https://gaffi.org/>> Acessado em 1 maio de 2022.

Goemaere B, Becker P, Van Wijngaerden E, Maertens J, Spriet I, Hendrickx M, Lagrou K. 2017. Increasing candidemia incidence from 2004 to 2015 with a shift in epidemiology in patients pre-exposed to antifungals. *Mycoses*, 61(2): 127-133. DOI: 10.1111/myc.12714

Gómez-Casanova N, Lozano-Cruz T, Soliveri J, Gomez R, Ortega P, Copa-Patiño JL, Heredero-Bermejo I. 2021. Eradication of *Candida albicans* Biofilm Viability: *In Vitro* Combination Therapy of Cationic Carbosilane Dendrons Derived from 4-Phenylbutyric Acid with AgNO₃ and EDTA. *Journal of Fungi*. 7(7): 574. DOI: 10.3390/jof7070574

González-Lara MF, Sifuentes-Osornio J, Ostrosky-Zeichner L. 2017. Drugs in Clinical Development for Fungal Infections. *Drugs*, 77(14): 1505-1518. DOI: 10.1007/s40265-017-0805-2

Greenbaum A, Hasany S, Rootman D. 2004. Optisol vs Dexsol as storage media for preservation of human corneal epithelium. *Eye*, 18: 519-524. DOI: 10.1038/sj.eye.6700693

Gruener AM, Allen F, Stanford MR, Graham EM. 2016. *Aspergillus fumigatus* Endophthalmitis with Necrotizing Scleritis following Pars Plana Vitrectomy. *Case Reports in Ophthalmological Medicine*, vol. 2016, Article ID 9289532, 3 p. DOI: 10.1155/2016/9289532

Gupta A, Srinivasan R, Kaliaperumal S, Saha I. 2006. Post-traumatic fungal endophthalmitis-a prospective study. *Eye*, 22(1): 13–17. DOI: 10.1038/sj.eye.6702463

Hayashi Y, Eguchi H, Toibana T, Mitamura Y, Yaguchi T. 2014. Polymicrobial sclerokeratitis caused by *Scedosporium apiospermum* and *Aspergillus cibarius*. *Cornea*, 33(8): 875–877. DOI: 10.1097/ico.0000000000000172

Helene O, Helene AF. 2011. Alguns aspectos da óptica do olho humano. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 33(3): 3312. DOI: 10.1590/S1806-11172011000300012.

Hwang HJ, Lee YW, Koh KM, Hwang KY, Kwon YA, Song SW, Kim BY, Kim KY. 2020. Lenticular fungal infection caused by *Aspergillus* in a patient with traumatic corneal laceration: a case report. *BMC Ophthalmology*, 20(1). DOI: 10.1186/s12886-020-01441-w

Imamura Y, Chandra J, Mukherjee PK, Lattif AA, Szczotka-Flynn LB, Pearlman E, Lass JH, O'Donnell K, Ghannoum MA. 2008. Fusarium and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(1): 171-182.

Iñigo M, Pemán J, Del Pozo JL. 2012. Antifungal activity against *Candida* biofilms. *The International Journal of Artificial Organs*, 35(10): 780-791. DOI: 10.5301/ijao.5000170

Iwahashi C, Eguchi H, Hotta F, Uezumi M, Sawa M, Kimura M, Yaguchi T, Kusaka S. 2020. Orbital abscess caused by *Exophiala dermatitidis* following posterior subtenon injection of triamcinolone acetonide: a case report and a review of literature related to *Exophiala* eye infections. *BMC Infectious Diseases*, 20(1). DOI: 10.1186/s12879-020-05294-y

Izquierdo AA, Melhem MSC, Bonfietti LX, Tudela JLR. 2015. Susceptibility test for fungi: Clinical and Laboratorial correlations in Medical Mycology. *Revista*

do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 57(suplemento 19): 57–64. DOI: 10.1590/S0036-46652015000700011

Jaramillo S, Varon CL. 2013. *Curvularia lunata* endophthalmitis after penetrating ocular trauma. Retin Cases Brief Rep, 7(4): 315-8. DOI: 10.1097/ICB.0b013e31828ef0a9. PMID: 25383827.

Jenks J, Hoenigl M. 2018. Treatment of Aspergillosis. Journal of Fungi, 4(3): 98. DOI: 10.3390/jof4030098

Jin KW, Jeon HS, Hyon JY, Wee WR, Suh W, Shin YJ. 2014. A case of fungal keratitis and onychomycosis simultaneously infected by *Trichophyton* species. BMC Ophthalmology, 14(1). DOI: 10.1186/1471-2415-14-90

Joaquim AR, Pippi B, de Cesare MA, Rocha da, Boff RT; Staudt KJ; Ruaro TC; Zimmer AR; de Araújo BV; Silveira GP; Martins AF; Teixeira ML; dos Santos FP; Fuentefria AM; de Andrade SF. 2019. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. Chemical Biology & Drug Design, 93: 1186-1196. DOI : 10.1111/cbdd.13435

Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR and Rex JH. 2004. Combination antifungal therapy. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 48(3): 693-715. DOI: 10.1128/AAC.48.3.693-715.2004

Kadri D, Crater AK, Lee H, Solomon VR, Ananvoranich S. 2014. The potential of quinoline derivatives for the treatment of *Toxoplasma gondii* infection. Experimental Parasitology, 145: 135-144. DOI: 10.1016/j.exppara.2014.08.008

Kah TA, Yong KC, Rahman RA. 2011. Disseminated fusariosis and endogenous fungal endophthalmitis in acute lymphoblastic leukemia following platelet transfusion possibly due to transfusion-related immunomodulation. BMC Ophthalmol, 2(11): 30. DOI: 10.1186/1471-2415-11-30.

Kalkanci A, Ozdek S. 2010. Ocular Fungal Infections. Current Eye Research, 36(3): 179–189. DOI: 10.3109/02713683.2010.533810

- Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(19): 5678-5698. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.04.045
- Kauffman CA. 2016. Endoftalmite Fúngica Exógena. Em: Durand M, Miller J, Young L. Endoftalmite Springer, Cham.
- Kaur IP, Kakkar S. 2010. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(11): 1303-1327. DOI:10.1517/17425247.2010.525230
- Kernien JF, Snarr BD, Sheppard DC, Nett JE. 2018. The interface between fungal biofilms and innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01968
- Kiatos E, Armstrong JJ, Hutnik CM, Tsioros SM, Malvankar-Mehta MS, Hodge WG. 2017. The value of corneoscleral rim cultures in keratoplasty: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Clinicoecon Outcomes Res*, 9(9): 459-474. DOI: 10.2147/CEOR.S139949
- Klotz SA, Penn CC, Negvesky G J, Butrus S. I. 2000. Fungal and Parasitic Infections of the Eye. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4): 662–685. DOI: 10.1128/cmr.13.4.662-685.2000
- Krajina MR, Vidovic I, Cepulic BG. 2022. Cornea microbiology contamination rate depending on post mortem time, retrospective analysis at croatian tissue and cell bank, UHC Zagreb *BMJ Open Ophthalmology*. DOI: 10.1136/bmjophth-2022-EEBA.36
- Kristanc L, Božič B, Jokhadar ŠZ, Dolenc MS, Gomišček G. 2018. The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1861(2): 418-430. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.11.006

Lakhani P, Patil A, Majumdar S. 2019. Challenges in the Polyene- and Azole-Based Pharmacotherapy of Ocular Fungal Infections. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. DOI:10.1089/jop.2018.0089

Lashof AML, Rothova A, Sobel JD, Ruhnke M, Pappas PG, Viscoli C, Schlamm HT, Oborska IT, Rex JH, Kullberg BJ. 2011. Ocular manifestations of candidemia. *Clinical Infectious Diseases*, 53(3): 262–268. DOI: 10.1093/cid/cir355

Layer N, Cevallos V, Maxwell AJ, Hoover C, Keenan JD, Jeng BH. 2014. Efficacy and safety of antifungal additives in Oprisol-GS corneal storage medium. *JAMA Ophthalmol*. 132(7): 832-837. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.397

Lee C-Y, Chen H-C, Hsiao C-H, Lin H-C, Sun C-C, Lai C-C, Ma DH-K. 2016. Recurrent fungal keratitis and blepharitis caused by *Aspergillus flavus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5): 1216–1218. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0453

Leite ECS. 2014. Ceratite infecciosa, endoftalmite e avaliação da formação de biofilme fúngica e nova formulação antiséptica para lentes de contato – Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE.

Lever M, Wilde B, Pfortner R, Deuschl C, Witzke O, Bertram S, Eckstein A, Rath P-M. 2021. Orbital aspergillosis: a case report and review of the literature. *BMC Ophthalmology*, 21(1). DOI: 10.1186/s12886-020-01773-7

Liu M-Y, Zhang L, Yin X-L, Sun S-Y. 2019. Endophthalmitis associated with fungal keratitis and penetrating injuries in North China. *European Journal of Ophthalmology*, 112067211983389. DOI: 10.1177/1120672119833896

Lockhart SR, Guarner J. 2019. Emerging and reemerging fungal infections. *Semin Diagn Pathol*, 36(3): 177-181. DOI: 10.1053/j.semmp.2019.04.010

- Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. 2017. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1): 19-31. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.107
- Lübke J, Auw-Hädrich C, Meyer-ter-Vehn T, Emrani E, Reinhard T. 2016. *Fusarien* keratitis mit dramatischem Ausgang. *Der Ophthalmologe*, 114(5): 462–465. DOI: 10.1007/s00347-016-0303-z
- Lupia T, Corcione S, Fea AM, Reibaldi M, Fallico M, Petrillo F, Galdiero M, Scabini S, Polito MS, Ciabatti U, De Rosa FG. 2020. Exogenous Fungal Endophthalmitis: Clues to *Aspergillus* Aetiology with a Pharmacological Perspective. *Microorganisms*, 9(1): 74. DOI: 10.3390/microorganisms9010074
- Mahmoudi S, Masoomi A, Ahmadikia K, Tabatabaei SA, Soleimani M, Rezaie S, Ghahvechian H, Banafsheafshan A. 2018. Fungal keratitis: An overview of clinical and laboratory aspects. *Mycoses*, 61(12): 916-930. DOI: 10.1111/myc.12822
- Maia, Núbia Cristina de Freitas. Fundamentos básicos da oftalmologia e suas aplicações. Palmas: Eduft, 2018. 122 p.
- Maitray A, Rishi E, Rishi P, Gopal L, Bhende P, Ray R, Therese KL. 2019. Endogenous endophthalmitis in children and adolescents. *Indian Journal of Ophthalmology*, 67(6): 795-800 DOI: 10.4103/ijo.IJO_710_18
- Mao X, Schimmer AD. 2008. The toxicology of clioquinol. *Toxicol Lett*, 182(1-3): 1-6. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.08.015
- Massa H, Riat A, Panos GD. 2020. First report of a new corneal pathogen: *Phaeoacremonium parasiticum*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39: 2477–2480. DOI: 10.1007/s10096-020-03980-y
- Mehrandish S, Mirzaeei S. 2021. A Review on Ocular Novel Drug Delivery Systems of Antifungal Drugs: Functional Evaluation and Comparison of

Conventional and Novel Dosage Forms. *Adv Pharm Bull*, 11(1): 28-38. DOI: 10.34172/apb.2021.003

Merchant A, Zacks CM, Wilhelmus K, Durand M, Dohlman CH. 2001. Candidal Endophthalmitis After Keratoplasty. *Cornea*, 20(2), 226–229. DOI: 10.1097/00003226-200103000-00026

Mills B, Radhakrishnan N, Rajapandian SGK, Rameshkumar G, Lalitha P, Prajna NV. 2020. The role of fungi in fungal keratitis. *Experimental Eye Research*, 202:108372. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108372

Mistò R, Giurgola L, Pateri F, Limongelli A, Ragazzi E, D'Amato Tóthová J. 2020. A new storage medium containing amphotericin B versus Optisol-GS for preservation of human donor corneas. *British Journal of Ophthalmology*, bjophthalmol–2020–317136. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-317136

Mitani A, Shiraishi A, Miyamoto H, Sunada A, Ueda A, Asari S, Zheng X, Yamamoto Y, Hara Y, Ohashi Y. 2014. Fungal keratitis caused by *Beauveria bassiana*: drug and temperature sensitivity profiles: a case report. *BMC Res Notes*, 7(677). DOI: 10.1186/1756-0500-7-677

Mitsuoka Y, Soma T, Maruyama K, Nishida K. 2021. *Fusarium* infection complicating rheumatic keratitis that acutely progressed to endophthalmitis during regular infusion of tocilizumab: a case report. *BMC Ophthalmology*, 21(1). DOI: 10.1186/s12886-021-01981-9

Muhammed M, Anagnostou T, Desalermos A, Kourkoumpetis TK, Carneiro HA, Glavis-Bloom J, Coleman JJ, Mylonakis E. 2013. *Fusarium* Infection: Report of 26 Cases and Review of 97 Cases From the Literature. *Medicine*, 92(6): 305-316. DOI: 10.1097/MD.0000000000000008

Mukherjee PK, Chandra J, Yu C, Sun Y, Pearlman E, Ghannoum MA. 2012. Characterization of *Fusarium* Keratitis Outbreak Isolates: Contribution of Biofilms to Antimicrobial Resistance and Pathogenesis. *Immunology and Microbiology*. 53(8): 4450-4457. DOI:10.1167/iovs.12-9848

Müller GG, Kara-José N, de Castro RS. 2013. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 72(2): 132–141. DOI: 10.1590/s0034-72802013000200014

Musuuza JS, Watson L, Parmasad V, Putman-Buehler N, Christensen L, Safdar N. 2021. Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 16(5): e0251170. DOI: 10.1371/journal.pone.0251170

Nada WM, Al Aswad MA, El-Haig WM. 2017. Combined intrastromal injection of amphotericin B and topical fluconazole in the treatment of resistant cases of keratomycosis: a retrospective study. *Clin Ophthalmol*, 5(11): 871-874. DOI: 10.2147/OPHTH.S135112

Naha L, Elakhiri M, Hemmaoui B, Tagajdid R, Nadour K, Lmimouni B. 2013. Ethmoïdite aspergillaire compliquée d'un abcès orbitaire. *Journal de Mycologie Médicale*, 23(2): 136–139. DOI: 10.1016/j.mycmed.2013.04.004

Nett JE. 2014. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Review Anti-Infective Therapy*, 12(3): 375–382. DOI: 10.1586/14787210.2014.885838

Nikkhah M, Hashemi M, Habibi Najafi MB, Farhoosh R. 2017. Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 257: 285–294. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021

O'Shaughnessy E, Meletiadis J, Stergiopoulou T, Demchok J, Walsh T. 2006. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6): 1168–1176. DOI: 10.1093/jac/dkl392

Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*, 52(1): 1. DOI: 10.1093/jac/dkg301

Oliveri V, Vecchio G. 2016. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 120: 252-274. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.05.007

Ong HS, Fung SSM, Macleod D, Dart JKG, Tuft SJ, Burton MJ. 2016. Altered Patterns of Fungal Keratitis at a London Ophthalmic Referral Hospital: An Eight-Year Retrospective Observational Study. *American Journal of Ophthalmology*, 168: 227–236. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.05

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Zeichner LO, Kullberg BJ. 2018. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 4(article number: 18026). doi:10.1038/nrdp.2018.26

Patil A, Majumdar S. 2017. Echinocandins in Ocular Therapeutics. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 33(5): 340-352. DOI: 10.1089/jop.2016.0186

Peng D, Li X, Liu P, Luo M, Chen S, Su K, Zhang Z, He Q, Qiu J, Li Y. 2018. Epidemiology of pathogens and antimicrobial resistance of catheter-associated urinary tract infections in intensive care units: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Infection Control*, 46(12): e81-e90. DOI: 10.1016/j.ajic.2018.07.012

Pereira LR. 2011. Preservação de córnea humana nos meios EUSOL-C[®] E OPTISOL-GS[®]: Estudo comparativo através da biomicroscopia, topografia, paquimetria e microscopia especular da córnea e da acuidade visual e qualidade de vida. Tese (Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Perlin DS. 2014. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. *Drugs*, 74(14): 1573-1585. DOI: 10.1007/s40265-014-0286-5

Pippi B, Joaquim AR, Merkel S, Zanette RA, Nunes MEM, da Costa Silva DG, Schimith LE, Teixeira ML, Franco JL, Fernandes de Andrade S, Fuentefria AM. 2021. Antifungal activity and toxicological parameters of 8-hydroxyquinoline-5-sulfonamides using alternative animal models. *J Appl Microbiol*, 130(6): 1925-1934. DOI: 10.1111/jam.14915.

Pippi B, Lopes W, Reginatto P, Silva FÉK, Joaquim, AR, Alves RJ, Silveira GP, Vainstein MH, Andrade SF, Fuentefria AM. 2019. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(1): 41-48. DOI: 10.1016/j.jsps.2018.07.017

Pippi B, Reginatto P, Dalla Lana D, Teixeira ML, Franco L, Alves R, Andrade SF, Fuentefria AM. 2017. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Medical Mycology*, 55(7): 763-773. DOI: 10.1093/mmy/myx003

Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2013. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Design, Development and Therapy*, 7: 1157-1178. DOI: 10.2147/DDDT.S49763

Prajna NV, Krishnan T, Mascarenhas J, Rajaraman R, Prajna L, Srinivasan M, Raghavan A, Oldenburg CE, Ray KJ, Zegans ME, McLeod SD, Porco TC, Acharya NR, Lietman TM; Mycotic Ulcer Treatment Trial Group. 2013. The mycotic ulcer treatment trial: a randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *JAMA Ophthalmol*, 131(4): 422-9. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2013.1497

Prajna NV, Krishnan T, Rajaraman R, Patel S, Shah R, Srinivasan M, Devi L, Das M, Ray KJ, O'Brien KS, Oldenburg CE, McLeod SD, Zegans ME, Acharya NR, Lietman TM, Rose-Nussbaumer J, Mycotic Ulcer Treatment Trial Group. 2017. Adjunctive Oral Voriconazole Treatment of *Fusarium* Keratitis: A

Secondary Analysis From the Mycotic Ulcer Treatment Trial II. JAMA Ophthalmol, 135(6): 520-525. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2017.0616

Prajna NV, Krishnan T, Rajaraman R, Patel S, Srinivasan M, Das M, Ray KJ, O'Brien KS, Oldenburg CE, McLeod SD, Zegans ME, Porco TC, Acharya NR, Lietman TM, Rose-Nussbaumer J; Mycotic Ulcer Treatment Trial II Group. 2016. Effect of Oral Voriconazole on Fungal Keratitis in the Mycotic Ulcer Treatment Trial II (MUTT II): A Randomized Clinical Trial. JAMA Ophthalmol, 134(12): 1365-1372. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2016.4096 B

Prajna NV, Lalitha P, Rajaraman R, Krishnan T, Raghavan A, Srinivasan M, O'Brien KS, Zegans M, McLeod SD, Acharya NR, Keenan JD, Lietman TM, Nussbaumer JR, the Mycotic Ulcer Treatment Trial Group. 2016. Changing Azole Resistance: A Secondary Analysis of the MUTT I Randomized Clinical Trial. JAMA Ophthalmol, 134(6): 693-696. DOI:10.1001/jamaophthalmol.2016.0530 A

Prajna NV, Mascarenhas J, Krishnan T, Reddy PR, Prajna L, Srinivasan M, Vaitilingam CM, Hong KC, Lee SM, McLeod SD, Zegans ME, Porco TC, Lietman TM, Acharya NR. 2010. Comparison of natamycin and voriconazole for the treatment of fungal keratitis. Arch Ophthalmol, 128(6): 672-8. DOI: 10.1001/archophthalmol.2010.102

Puah SH, Ng J, Ang B, Xu H, Agrawal R, Ho S-L. 2016. Recurrent *Aspergillus terreus* Endophthalmitis from Focal Bronchiectasis. Ocular Immunology and Inflammation, 26(3): 358–361. DOI: 10.1080/09273948.2016.1199716

Raies AB, Bajic VB. 2016. *In silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci. 6(2): 147-172. doi: 10.1002/wcms.1240

Rajabzadeh A, Shokri D, Aboutalebian S, Morovati H, Mohammadi A, Samani RE, Mohammadi R. 2020. A fatal case of bloodstream infection by *Fusarium*

solani in a patient with adrenocortical carcinoma from Isfahan, Iran. *Int J Cancer Manag*, 13(2): e98610. DOI: 10.5812/ijcm.98610.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. 2012. Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, 1-14. DOI: 10.1155/2012/528521

Ramage G, Robertson SN, Williams C. 2014. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(2): 114-120. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.023

Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL. 2001. Standardized method 458 for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemothe* 45, 2475-2479.

Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. 2007. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). *Mycopathologia*, 164(6): 301-306. DOI: 10.1007/s11046-007-9068-x

Ranjith K, Nagapriya B, Shivaji S. 2022. Polymicrobial biofilms of ocular bacteria and fungi on ex vivo human corneas. *Sci Rep*, 12: 11606). DOI: 10.1038/s41598-022-15809-z

Rauchman SH, Locke B, Albert J, De Leon J, Peltier MR, Reiss AB. 2023. Toxic External Exposure Leading to Ocular Surface Injury. *Vision (Basel)*. 7(2): 32. doi: 10.3390/vision7020032

Reddy JC, Rapuano CJ, Eagle RC Jr, Shields CL, Shields JA. 2013. Late-onset necrotizing scleritis due to pigmented mycetoma (dematiaceous fungi) in 2 cases. *Cornea*, 32(4): 450-453. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318254a4c6

Reginatto P, Agostinetti GJ, Fuentefria RDN, Marinho DR, Pizzol MD, Fuentefria AM. 2023. Eye fungal infections: a mini review. *Arch Microbiol*. 205(6): 236. DOI: 10.1007/s00203-023-03536-6

Reginatto P, Bergamo VZ, Berlitz SJ, Guerreiro ICK, de Andrade SF, Fuentefria AM. 2020. Rational selection of antifungal drugs to propose a new formulation

strategy to control *Candida* biofilm formation on venous catheters. *Braz J Microbiol.* 51(3): 1037-1049. DOI: 10.1007/s42770-020-00242-z

Reginatto P, Joaquim AR, Rocha DA, Berlitz SJ, Kulkamp'guerreiro IC, de Andrade SF, Fuentefria AM. 2022. 8-hydroxyquinoline and quinazoline derivatives as potential new alternatives to combat *Candida* spp. biofilm. *Letters In Applied Microbiology*, 74(3): 395-404. DOI: 10.1111/lam.13607

Reginatto P. 2023. Dados não publicados.

Registro Brasileiro de Transplantes. Disponível em: www.abto.org.br (Acesso em 28 de julho de 2022 - dados de janeiro/maio de 2019).

Registro Brasileiro de Transplantes. Disponível em: www.abto.org.br (Acesso em 03 de setembro de 2023 - dados de janeiro/março de 2023).

Reinoso R, Carreño E, Hileeto D, Corell A, Pastor JC, Cabrero M, Vázquez L, Calonge, M. 2013. Fatal disseminated *Scedosporium prolificans* infection initiated by ophthalmic involvement in a patient with acute myeloblastic leukemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(3): 375–378. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.006

Relhan N, Forster RK, Flynn Jr. HW. 2018. Endophthalmitis: Then and Now. *American Journal of Ophthalmology*, 187:xx-xxvii. DOI: 10.1016/j.ajo.2017.11.021

Ritterband DC, Shah MK, Meskin SW, Seedor JA, Koplín RS, Perez W, Yang R, Hu DN, Dahl P. 2007. Efficacy and safety of Voriconazole as an additive in Optisol GS. *Cornea*, 26(3): 343–347. DOI: 10.1097/ico.0b013e31802d82e8

Robbins N, Wright GD, Cowen LE. 2016. Antifungal Drugs: the current armamentarium and development of new agents. *Microbiol Spectrum*, 4(5): 903-922. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016

Rodella U, Bosio L, Giurgola L, Gatto C, Rossi O, Ferrari S, Tothova JD. 2022. A porcine cornea and lamellar tissue model to investigate effects of storage

conditions on corneal preservation. *BMJ Open Ophthalmol.* 7(Suppl 2):A8. doi: 10.1136/bmjophth-2022-EEBA.18.

Roy R, Panigrahi PK., Pal SS, Mukherjee A, Bhargava M. 2014. Post-traumatic Endophthalmitis Secondary to Keratomycosis Caused by *Scedosporium apiospermum*. *Ocular Immunology and Inflammation*, 1–3. DOI: 10.3109/09273948.2014.902078

Sahay P, Singhal D, Nagpal R, Maharana PK, Farid M, Gelman R, Sinha R, Agarwal T, Titiyal JS, Sharma N. 2019. Pharmacologic therapy of mycotic keratitis. *Survey of Ophthalmology*, 64(3): 380-400. DOI: 10.1016/j.survophthal.2019.02.007

Sakita KM, Faria DR, da Silva EM, Tobaldini-Valério FK, Kioshima ES, Svidzinski TIE, Bonfim-Mendonça PdeS. 2017. Healthcare workers' hands as a vehicle for the transmission of virulent strains of *Candida* spp.: A virulence factor approach. *Microbial Pathogenesis*, 113: 225-232. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.10.044

Sashidhara KV, Kumar A, Bhatia G, Khan MM, Khanna AK, Saxena JK. 2009. Antidyslipidemic and antioxidative activities of 8-hydroxyquinoline derived novel keto-enamine Schiffs bases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4): 1813-1818. DOI: 10.1016/j.ejmech.2008.08.004

Sav H, Rafati H, Öz Y, Cilo BD, Ener B, Mohammadi F, Ilkit M, van Diepeningen AD, Seyedmousavi S. 2018. Biofilm formation and resistance to fungicides in clinically relevant members of the fungal genus *Fusarium*. *Journal Fungi*. 4(1): 16. DOI: 10.3390/jof4010016

Schrecker J, Seitz B, Berger T, Daas L, Behrens-Baumann W, Auw-Hädrich C, Schütt S, Kerl S, Rentner-Andres S, Hof H. 2021. Malignant keratitis caused by a highly-resistant strain of *Fusarium tonkinense* from the *Fusarium solani* complex. *Journal of Fungi*, 7(12): 1093. DOI: 10.3390/jof7121093

Pregão Eletrônico. Disponível em: <https://rondonia.ro.gov.br/wp-content/uploads/2023/03/ATA-5.pdf> (Acesso em 02 de setembro de 2023).

Silva RA, Sridhar J, Miller D, Wykoff CC, Flynn HW. 2015. Exogenous fungal endophthalmitis: an analysis of isolates and susceptibilities to antifungal agents over a 20-year period (1990–2010). *American Journal of Ophthalmology*, 159(2): 257–264. DOI: 10.1016/j.ajo.2014.10.027

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2): 288-305. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x

Silva S, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. 2017. *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *Journal of Fungi*, 3(1): 8. DOI: 10.3390/jof3010008

Singh R, Gupta N, Vanathi M, Tandon R. 2019. Corneal transplantation in the modern era. *Indian J Med Res*, 150(1): 7-22. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_141_19

Singh S, Shrivastav A, Agarwal M, Gandhi A, Mayor R, Paul L. 2018. A rare case of scleral buckle infection with *Curvularia* species. *BMC Ophthalmology*, 18(1). DOI: 10.1186/s12886-018-0695-4

Sitnova AV, Svetozarskiy SN. 2023. Modern Technologies in Diagnosis of Fungal Keratitis (Review). *Sovrem Tekhnologii Med*. 15(2): 73-84. DOI: 10.17691/stm2023.15.2.07

Słowik M, Biernat MM, Urbaniak-Kujda D, Kapelko-Słowik K, Misiuk-Hojło M. 2015. Mycotic Infections of the Eye. *Adv Clin Exp Med.*, 24(6): 1113-1117. DOI: 10.17219/acem/50572

Sousa SJF, Barretto S. 2017. Preservação de córneas: um breve histórico. *EOftalmo*, 3(3): 23-30. 10.17545/eOftalmo/2017.100

Spallone A, Schwartz IS. 2021. Emerging Fungal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2): 261-277. DOI: 10.1016/j.idc.2021.03.014

Srinivasan, M. 2004. Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol*, 15: 321–327. DOI: 10.1097/00055735-200408000-00008

Stein C, Makarewicz O, Bohnert JA, Pfeifer Y, Kesselmeier M, Hagel S, Pletz MW. 2015. Three Dimensional Checkerboard Synergy Analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against Multidrug-Resistant Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *PLOS ONE*, 10(6): e0126479. DOI: 10.1371/journal.pone.0126479

Stepanovic´ S, Vukovic´ D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic´ S, C´ Irkovic´ I, Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing 470 conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by 471 staphylococci. *APMIS* 115: 891-899. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x

Thomas PA, Kaliamurthy J. 2013. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(3): 210–220. DOI: 10.1111/1469-0691.12126

Thomas PA. 2003. Current Perspectives on Ophthalmic Mycoses. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4): 730–797. DOI: 10.1128/cmr.16.4.730-797.2003 (A)

Thomas PA. 2003. Fungal infections of the cornea. *Eye*, 17(8): 852–862. DOI: 10.1038/sj.eye.6700557 (B)

Thompson GR, Lewis JS. 2009. Pharmacology and clinical use of voriconazole. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(1): 83–94. DOI: 10.1517/17425250903463878

Ting DSJ, Bignardi G, Koerner R, Irion LD, Johnson E, Morgan SJ, Ghosh S. 2019. Polymicrobial Keratitis With *Cryptococcus curvatus*, *Candida*

parapsilosis, and *Stenotrophomonas maltophilia* After Penetrating Keratoplasty: A Rare Case Report With Literature Review. *Eye Contact Lens*, 45(2): e5-e10. DOI: 10.1097/ICL.0000000000000517

Todokoro D, Hoshino J, Yo A, Makimura K, Hirato J, Akiyama H. 2018. *Scedosporium apiospermum* infectious scleritis following posterior subtenon triamcinolone acetonide injection: a case report and literature review. *BMC Ophthalmology*, 18(1). DOI: 10.1186/s12886-018-0707-4

Tran D, Dhaliwal D, Kamyar R, Jhanji V, Kowalski RP. 2019. Effect of Optisol supplementation with 0.255 µg/mL Amphotericin B on elimination of yeast at 5°C. *Cornea*, 38(7): 901-904. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001969

van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, van der Lee TAJ, Waalwijk C. 2015. Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Current Fungal Infect Rep*, 9(3): 135-143. DOI: 10.1007/s12281-015-0225-2

Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. 2012. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*, 2012:713687. DOI: 10.1155/2012/713687

Vicente A, Pedrosa Domellöf F, Byström B. 2017. *Exophiala phaeomuriformis* keratitis in a subarctic climate region: a case report. *Acta Ophthalmologica*, 96(4), 425-428. DOI: 10.1111/aos.13624

Vilela RC, Vilela L, Vilela P, Vilela R, Motta R, Pôssa AP, de Almeida C, Mendoza L. 2013. Etiological agents of fungal endophthalmitis: diagnosis and management. *International Ophthalmology*, 5(32). DOI: 10.1007/s10792-013-9854-z

Weber DJ, Peppercorn A, Miller MB, Sickbert-Benett E, Rutala WA. 2009. Preventing healthcare-associated *Aspergillus* infections: review of recent CDC/HICPAC recommendations. *Medical Mycology*, 47(s1): S199–S209. DOI: 10.1080/13693780802709073

Welscher YM, Napel HH, Balagué MM, Souza CM, Riezman H, de Kruijff B, Breukink E. 2007. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10): 6393–6401. DOI:10.1074/jbc.m707821200

Wong EH, Revankar SG. 2016. Dematiaceous Molds. *Infect Dis Clin North Am*, 30(1): 165-78. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.007

www.nhs.uk (Acesso em 28 de maio de 2022).

Wykoff CC, Flynn HW, Miller D, Scott IU, Alfonso EC. 2008. Exogenous Fungal Endophthalmitis: Microbiology and Clinical Outcomes. *Ophthalmology*, 115(9): 1501–1507. DOI: 10.1016/j.optha.2008.02.027

Yeşiltaş YS, Özcan G, Demirel S, Yalçındağ N. 2019. Culture-Proven *Candida albicans* Endogenous Endophthalmitis in a Patient with Onychomycosis. *Ocular Immunology and Inflammation*, 1–4. DOI: 10.1080/09273948.2019.1568503

You Z, Zhang C, Ran Y. 2020. The effects of clioquinol in morphogenesis, cell membrane and ion homeostasis in *Candida albicans*. *BMC Microbiology*, 20(1). DOI: 10.1186/s12866-020-01850-3

Yousif A, Jamal MA, Raad I. 2015. Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv Exp Med Biol*, 830:157-79. DOI: 10.1007/978-3-319-11038-7_1

Zhang X, Sun X, Wang Z, Zhang Y, Hou W. 2012. Keratitis-associated fungi form biofilms with reduced antifungal drug susceptibility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53(12): 7774-8. DOI: 10.1167/iovs.12-10810

9. Anexos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE NOVO MEIO DE PRESERVAÇÃO DE CÓRNEAS HUMANAS PARA TRANSPLANTE COM ESPECTRO DE AÇÃO ANTIFÚNGICO

Pesquisador: Alexandre Meneghello Fuentefria

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 28474820.5.0000.5347

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.283.197

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa que tem como pesquisador responsável Alexandre Meneghello Fuentefria, intitulado "DESENVOLVIMENTO DE NOVO MEIO DE PRESERVAÇÃO DE CÓRNEAS HUMANAS PARA TRANSPLANTE COM ESPECTRO DE AÇÃO ANTIFÚNGICO" a ser executado de 03/2020 a 03/2022 e que pretende "avaliar a segurança do novo meio de preservação desenvolvido sobre o tecido da córnea.

Como hipótese, os pesquisadores informam que "o desenvolvimento de um novo meio de preservação de córneas alternativo, totalmente nacional, contendo um agente antifúngico inédito irá controlar o crescimento oportunista de fungos patogênicos nesses meios, os quais geralmente são os principais causadores de ceratite e endoftalmite pós-transplante."

Foi apresentada uma fundamentação teórica bem estruturada, considerando aspectos relativos às infecções fúngicas, oculares, fatores de risco e tratamentos.

Trata-se de um projeto que será avaliado pelo CEP/UFRGS (Instituição Proponente) referente a projeto de tese de doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 4.283.197

Objetivo da Pesquisa:

Como objetivo geral: desenvolvimento de um novo meio de preservação de córneas alternativo, totalmente nacional, contendo um agente antifúngico inédito para o controle de fungos potencialmente resistentes causadores de ceratite e endoftalmite pós-transplante.

Como objetivos específicos:

- a) Determinar o perfil de suscetibilidade das cepas fúngicas selecionadas (*Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *Aspergillus fumigatus*) frente aos antifúngicos de escolha no tratamento da ceratite e endoftalmite;
- b) Caracterizar as cepas quanto a sua capacidade de formação de biofilme antes e depois do cultivo nomeio de preservação (Optisol-GS®);
- c) Síntese de polímeros para formação de sistemas de liberação controlada específica e seletiva de antifúngicos (para adição no meio de preservação);
- d) Desenvolvimento farmacotécnico de um novo meio de preservação de córneas contendo o antifúngico PH151;
- e) Avaliação da atividade antifúngica do novo meio de preservação de córneas contendo o antifúngico PH151 sobre fungos patogênicos sensíveis e resistentes aos antifúngicos de escolha no tratamento da ceratite e endoftalmite;
- f) Avaliar a atividade antibiofilme do novo meio de preservação de córneas contendo o antifúngico PH151 em córneas estéreis cedidas pelo Serviço de Oftalmologia do HCPA;
- g) Avaliar a eficácia antifúngica do novo meio de preservação sobre a córnea infectada com diferentes espécies de fungos, inclusive multirresistentes;
- h) Avaliação da morfologia endotelial da córnea no novo meio de preservação com a finalidade de esclarecer a segurança toxicológica no tempo de conservação;
- i) Avaliação complementar da segurança do novo meio de preservação desenvolvido sobre o tecido da córnea.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Na nova versão, foram apresentados como riscos a potencial quebra de confidencialidade e as medidas para minimiza-la (PENDÊNCIA ATENDIDA)

Como benefícios, os pesquisadores relatam o “desenvolvimento de um novo meio de preservação de córneas alternativo aos já existentes, mais barato, totalmente nacional, com espectro de ação

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farrroupilha **CEP:** 90.040-060
Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 4.283.197

antimicrobiano mais amplo (abrangendo fungos também, inclusive multirresistentes) e seguro. Assim, espera-se alcançar resultados promissores para a prática clínica, com produção de tecnologias e produtos de propriedade intelectual de grande importância em saúde pública. Ainda, enriquecer e aprofundar conhecimentos com publicações de alto impacto e a submissão de uma patente com o novo meio de preservação de córneas.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme informado pelos pesquisadores, “os experimentos e avaliações microbiológicas serão realizados nas dependências do Laboratório de Micologia Aplicada, localizado no anexo II da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os ensaios de síntese serão realizados na mesma Instituição, no Laboratório do “Pharmaceutical Synthesis Group”. A avaliação da morfologia endotelial da córnea no novo meio de preservação com a finalidade de esclarecer a segurança no tempo de conservação (ensaios toxicológicos) será realizado no serviço de Oftalmologia do HCPA.”

Na nova versão anterior foi incluído Termo de Concordância assinado pela pesquisadora Diane Marinho, identificada como responsável pelo setor de oftalmologia do HCPA (PENDÊNCIA ATENDIDA).

Serão realizados ensaios preliminares em cepas fúngicas a partir da coleção de fungos do laboratório do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada da UFRGS. Posteriormente será realizado ensaio de síntese de novo antifúngico que será acrescido ao meio de preservação. Novamente as cepas padrão serão testadas neste novo composto formado.

A partir deste ponto, será realizada avaliação da atividade antifúngica sobre a córnea infectada. Conforme descrito pelo pesquisador “Todos os halos córneos-esclerais preservados em Optisol-GS® (Bausch+Lomb) utilizados em transplantes de córnea no HCPA serão divididos após a cirurgia no bloco cirúrgico: uma das metades será colocada no tubo com o meio comercial e a outra metade será colocada no tubo contendo o novo meio de preservação. Os tubos serão refrigerados a 4°C por 24h. Após esse período, os meios receberão uma alíquota de inóculo fúngico (concentrações testadas para leveduras 1-5 x 10⁵ UFC/mL e para fungos filamentosos 1-3 x 10⁴ UFC/mL). Nos tempos 8, 12, 24, 36 e 48 horas de incubação, alíquotas de 10 uL serão removidas e plaqueadas em ágar sabouroud dextrose, incubação a 35 °C e posterior determinação do número de UFC.”

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farrroupilha

CEP: 90.040-060

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISADA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL - PROPESQ
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.283.197

Após, a partir deste material, será realizada a aferição da capacidade de prevenção da formação do biofilme fúngico sobre a córnea.

Posteriormente, será realizado ensaio da membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha ou HET-CAM.

Ao final do projeto são citados os números amostrais necessários para cada experimento. Conforme citado pelo pesquisador, "Um total de aproximadamente 117 amostras (o que contempla o botão córneo-escleral como um todo ou apenas o halo deste botão), como possíveis erros nos procedimentos dos ensaios poderão ocorrer, dessa forma, o n final total será de 129 amostras (cerca de 10% a mais sobre o número total necessário)." Na Plataforma Brasil é citado 36 indivíduos. Esclarecer se cada indivíduo fornecerá mais de um tecido ou de que forma será compatibilizado o tamanho amostral. Também há necessidade de justificativa para tamanho amostral. Em relação a este ponto, os pesquisadores esclarecem que "Cada ensaio necessita ser realizado, no mínimo, em triplicata para fins de análises estatísticas, controles positivos e negativos também são necessários para fins de comparação e garantia da confiabilidade dos resultados obtidos. Dessa forma, conforme descrito no projeto (compilado abaixo), 129 amostras serão necessárias (halos e botões córneos-esclerais). O número de indivíduos foi uma estimativa muito baixa, na verdade é muito difícil definir o número exato de indivíduos, uma vez que as amostras serão repassadas conforme disponibilidade e viabilidade das mesmas para o estudo. Assim, cada indivíduo pode doar as duas córneas ou apenas uma.

Considerando a justificativa anterior, o projeto de pesquisa deverá informar que se trata de amostra de conveniência. Se serão necessárias 129 amostras e, eventualmente, cada doador pode doar apenas uma córnea, este número deverá ser informado como tamanho amostral. Na nova versão da PB o número amostral foi alterado para 129. (PENDÊNCIA ATENDIDA)

Em relação ao financiamento, foi destacado que a responsabilidade é exclusiva do pesquisador principal. (PENDÊNCIA ATENDIDA).

Em função do parecer anterior ter sido emitido em 02/2020 e o retorno ter ocorrido somente em 09/2020, o cronograma foi adequado para início em 10/2020. (PENDÊNCIA ATENDIDA)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 4.283.197

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados.

Foi solicitada dispensa do TCLE com a seguinte justificativa: O projeto utilizará halos córneos-esclerais que seriam descartados após o procedimento de transplante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa encontra-se em condições de aprovação, de acordo com os aspectos éticos (CNS Resolução 466/12).

Considerações Finais a critério do CEP:

APROVADO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1501404.pdf	13/09/2020 00:52:12		Aceito
Outros	Oficio_HCPA.pdf	13/09/2020 00:49:38	Paula Reginatto	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP_Parecer.pdf	13/09/2020 00:41:47	Paula Reginatto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Paula_Reginatto_CEP_Corrigido.pdf	13/09/2020 00:38:56	Paula Reginatto	Aceito
Declaração de concordância	Oficio_PSG.pdf	07/02/2020 22:59:51	Paula Reginatto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	28/01/2020 16:33:15	Alexandre Meneghello Fuentefria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISADA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL - PROPESQ
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.283.197

PORTO ALEGRE, 17 de Setembro de 2020

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br