

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

Bárbara Souza da Costa

**ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DO CLIOQUINOL COMBINADO COM
CICLOPIROX E TERBINAFINA EM ENSAIOS *IN VITRO* E *EX VIVO***

Porto Alegre

2020

Bárbara Souza da Costa

**ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DO CLIOQUINOL COMBINADO COM
CICLOPIROX E TERBINAFINA EM ENSAIOS *IN VITRO* E *EX VIVO***

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

Orientador(a): Prof. Dr Alexandre Meneghello
Fuentefria

Coorientador(a): Dra. Bruna Pippi

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

da Costa, Bárbara
ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DO CLIOQUINOL COMBINADO
COM CICLOPIROX E TERBINAFINA EM ENSAIOS IN VITRO E EX
VIVO / Bárbara da Costa. -- 2020.
110 f.
Orientador: Alexandre Fuentefria.

Coorientadora: Bruna Pippi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Atividade antidermatofítica. 2. Novas opções
terapêuticas. 3. Sinergismo. 4. Clioquinol. 5. Modelos
ex vivo. I. Fuentefria, Alexandre, orient. II. Pippi,
Bruna, coorient. III. Título.

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

“As máquinas de pesquisa
mais poderosas que existem
são as pessoas.”

Jonh P. Barlow

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu querido Prof. Alexandre Fuentefria pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradecer por toda compreensão de sempre, por confiar e acreditar na minha capacidade me dando total liberdade para conseguir conduzir esse trabalho.

Também gostaria de agradecer à melhor coorientadora que eu poderia ter, minha Dra. Bruna Pippi. Obrigada Bru, por todo carinho, por ter sido meu braço direito, por nunca ter me deixado na mão e por estar sempre me orientando. Só tenho a te agradecer pela pessoa que tu és, amiga, terapeuta, conselheira. Saibas que tu és uma inspiração pra mim.

Gostaria de agradecer aos órgãos de fomento, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro que obtive para que este trabalho pudesse ser realizado.

Não posso deixar de agradecer a todos os colegas do laboratório GPMA, por terem me acolhido tão bem neste grupo e pelos momentos compartilhados. Gostaria de agradecer primeiramente à Paula, uma pessoa tão doce, meiga e uma mãezona dentro do grupo, sempre se colocando à disposição para ajudar. Meu muito obrigada também à Letícia, meu casal científico, embarcando junto comigo na jornada do mestrado. Vocês duas transformaram os exaustivos experimentos nos finais de semana e a convivência diária em momentos leves e tranquilos.

Não poderia deixar de agradecer ao Prof. Régis por abrir as portas do seu laboratório DrosoLab, onde pude realizar os ensaios com as lindas *Drosophila*. E da mesma maneira, agradecer à Simone por todo carinho e paciência em me ensinar e me ajudar a realizar os experimentos com as moscas.

Obrigada Ingrid, por ser essa pessoa maravilhosa e estar sempre presente, mesmo que no laboratório de cima, compartilhando os perrengues e sempre disposta a escutar. Obrigada pela certeza de que sempre posso contar contigo. Obrigada também a Bruna Zanotto e Camila Duarte. Muito obrigada às minhas amigas de toda uma vida: Roberta, Gabriela, Juliana, Luiza e Mariana. Agradecer também à minha amiga/irmã Lethícia, que mesmo estando no outro lado do mundo (literalmente, na China) esteve sempre presente em cada conquista. Meu muito obrigada à Manuella, é aquele ditado “Deus nos fez prima por que nenhuma mãe nos aguentaria como irmãs”. Apenas agradecer por todos momentos de lazer compartilhados,

principalmente os mates e os jogos do Inter. Todas vocês fizeram parte dessa caminhada.

Gostaria de agradecer ao meu namorado Felipe, por todo amor, carinho e compreensão durante esses anos. Obrigada por sempre estar presente e acompanhar cada passo e conquista minha nesses anos. Agradeço-te por ser paciente e escutar todas as minhas angústias. E, acima de tudo, te agradeço por estar sempre torcendo por mim e desejando um futuro maravilhoso pra nós.

O meu agradecimento mais importante, minha família, meus irmãos e principalmente, meus queridos pais, Elizabeth e Flávio, meus maiores incentivadores. Meu muito obrigada por todo apoio e incentivo, por me proporcionar a oportunidade de correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por me dar a certeza de que sempre terei alguém torcendo por mim. Obrigada por todo amor incondicional. Palavras não são suficientes para agradecer todo o amor de vocês. Esta conquista é dedicada a vocês. Amo muito vocês.

ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DO CLIOQUINOL COMBINADO COM CICLOPIROX E TERBINAFINA EM ENSAIOS *IN VITRO* E *EX VIVO*

Autor: Bárbara Souza da Costa

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

Coorientador(a): Dra. Bruna Pippi

RESUMO

Estima-se que as infecções fúngicas superficiais afetam cerca de 20 a 25% da população mundial. As dermatofitoses são conhecidas por acometer tanto os animais quanto os seres humanos. Pelo menos 30% das infecções por patógenos dermatofíticos em seres humanos são de causa zoonótica. O aumento da incidência dos casos de infecções fúngicas, associados com a falha terapêutica tem se tornado um grande desafio. Novas alternativas terapêuticas vêm sendo adotadas para o combate da resistência e recidiva dessas infecções fúngicas, tais como a reintrodução de fármacos no mercado e a terapia combinada. Desta forma, as atuais circunstâncias justificam o estudo da atividade antidermatofítica do clioquinol quando combinado com outros antifúngicos. Interações sinérgicas foram observadas para as associações testadas de clioquinol + terbinafina (42%), clioquinol + ciclopirox (50%) e clioquinol + ciclopirox + terbinafina (75%) e nenhum caso de antagonismo foi observado. As combinações duplas e triplas obtiveram efeito fungicida dependente do tempo para o isolado *T. rubrum* (TRU47). A combinação clioquinol + terbinafina não apresentou toxicidade em leucócitos humanos. Todas as associações testadas apresentaram baixa toxicidade em modelos alternativos como pele de orelha de suínos (não mostrando lesões microscópicas) e embriões de galinha (sendo classificadas como não irritantes). Quando analisados os resultados da atividade antidermatofítica das combinações dos agentes antifúngicos em cascos suínos, nota-se que apenas as combinações duplas conseguiram remover 100% das unidades formadoras de colônias (UFCs) formadas nos cascos suínos. Na inibição da formação do biofilme em pelos de origem animal, a combinação mais efetiva foi do clioquinol + ciclopirox. Entretanto, no ensaio de erradicação do biofilme pré-formado as melhores combinações foram a associação tripla e clioquinol + terbinafina, removendo quase que 100% das células. Em conjunto, os resultados deste estudo são altamente relevantes, pois baixas concentrações de agentes antifúngicos foram combinadas e obteve-se melhor ação e menor toxicidade. Desta forma, a utilização do clioquinol em combinação com fármacos antifúngicos é um achado sem precedentes e que, futuramente, poderá ser aplicado na clínica médica.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (115 p.) julho, 2020.

ANTIDERMATOPHYTIC ACTIVITY OF CLIOQUINOL COMBINED WITH CICLOPIROX AND TERBINAFINE IN *IN VITRO* AND *EX VIVO* TESTS

Author: Bárbara Souza da Costa

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-Advisor: Dra. Bruna Pippi

ABSTRACT

Superficial fungal infections are estimated to affect about 20 to 25% of the world population. Dermatophytoses are known to affect both animals and humans. At least 30% of infections by dermatophyte pathogens in humans are of zoonotic cause. The increased incidence of cases of fungal infections, associated with therapeutic failure has become a major challenge. New therapeutic alternatives have been adopted to combat the resistance and recurrence of these fungal infections, such as the reintroduction of drugs on the market and combination therapy. Thus, the current circumstances justify the study of the antidermatophytic activity of clioquinol when combined with other antifungals. Synergistic interactions were observed for the tested combinations of clioquinol + terbinafina (42%), clioquinol + ciclopirox (50%) and clioquinol + ciclopirox + terbinafina (75%) and no case of antagonism was observed. The double and triple combinations obtained a time-dependent fungicidal effect for the *T. rubrum* isolate (TRU47). The combination clioquinol + terbinafina did not show toxicity in human leukocytes. All tested associations showed low toxicity in alternative models such as pig ear skin (showing no microscopic lesions) and chicken embryos (being classified as non-irritating). When analyzing the results of the antidermatophytic activity of the combinations of antifungal agents in pig hooves, it is noted that only the double combinations were able to remove 100% of the colony forming units (CFU) formed in the pig hooves. In inhibiting the formation of biofilm in animal hair, the most effective combination was clioquinol + ciclopirox. However, in the preformed biofilm eradication test, the best combinations were the triple association and clioquinol + terbinafina, removing almost 100% of the cells. Together, the results of this study are highly relevant, since low concentrations of antifungal agents were combined and better action and less toxicity were obtained. Thus, the use of clioquinol in combination with antifungal drugs is an unprecedented finding and that, in the future, may be applied in the medical clinic.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (115 p.) julho, 2020.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS.....	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Infecções fúngicas	4
3.1.1	Dermatófitos	4
3.1.1.1	<i>Microsporum canis</i>	4
3.1.1.2	<i>Nannizzia gypsea</i>	5
3.1.1.3	<i>Trichophyton rubrum</i>	5
3.1.1.4	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	5
3.1.2	Infecções em humanos e animais	6
3.1.3	Biofilme	6
3.2	Terapia antifúngica.....	8
3.2.1	Ação sobre o ergosterol	9
3.2.2	Inibidores da síntese da β -1,3-d-glicana sintase.....	11
3.2.3	Inibidores da síntese de ácidos nucleicos	12
3.2.4	Inibidores da biossíntese de microtúbulos	12
3.2.5	Outros mecanismos	12
3.3	Resistência aos antifúngicos	13
3.4	Opções de combate à resistência	14
3.5	Modelos alternativos	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	Local e seleção dos microrganismos:	19
4.2	Agentes Antifúngicos:	19
4.3	Teste de suscetibilidade aos agentes antifúngicos:.....	19
4.4	Avaliação da interação dupla e tripla dos agentes antifúngicos (<i>Checkerboard</i>):	20
4.5	Ensaio do tempo de morte:	20
4.6	Avaliação da Toxicidade:.....	21
4.7	Avaliação do potencial de irritabilidade:	22
4.8	Determinação histopatológica em pele suína:	22
4.9	Avaliação da atividade antifúngica combinada em modelos <i>ex vivo</i> : unha e pelo.....	23

5.	RESULTADOS.....	28
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÃO	44
8.	PERSPECTIVAS.....	46
9.	REFERÊNCIAS.....	47
10.	APÊNDICES	57
10.1	Artigo 1.....	57
10.2	Artigo 2.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) do clioquinol, ciclopirox e terbinafina quando testados sozinhos e em combinação frente a dermatófitos.....	29
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biofilme em dermatófito.....	8
Figura 2. Alvo dos principais antifúngicos.....	9
Figura 3. Estrutura química do clioquinol, ciclopirox e terbinafina.....	19
Figura 4. Teste de ação antifúngica sobre modelo de onicomicose em cascos suínos.....	26
Figura 5. Teste de ação antifúngica sobre biofilme formado em pelos de origem animal.....	27
Figura 6. Curva do ensaio de tempo de morte para o clioquinol, terbinafina e ciclopirox nas suas CIMs e nas combinações duplas e tripla.....	30
Figura 7. Curva do ensaio de tempo de morte para as combinações comparando com os agentes antifúngicos sozinhos na mesma concentração.....	31
Figura 8. Porcentagem de viabilidade celular dos agentes antifúngicos clioquinol, terbinafina e ciclopirox nas suas CIMs e nas combinações duplas e tripla.....	32
Figura 9. Reações fisiológicas na membrana corioalantoide no ensaio HET-CAM	33
Figura 10. Avaliação histopatológica de células epidérmicas de orelha suína.....	34
Figura 11. Resultado do teste de ação antifúngica em modelo de onicomicose....	35
Figura 12. Avaliação da eficácia da proteção e remoção do biofilme fúngico das combinações dos antifúngicos em pelo de origem animal.....	36
Figura 13. Representação esquemática dos principais resultados obtidos no trabalho.....	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Ágar de Dextrose de Batata
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	“Clinical Laboratory Standards Institute”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GPMA	Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada
HE	Hematoxilina e Eosina
HET-CAM	“Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane”
ICBS	Instituto de Ciência Básicas da Saúde
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IFC	Instituto Federal Catarinense
II	Índice de Irritação
IND	Indiferente
INTER	Interação
MCA	<i>Microsporum canis</i>
MDR1	“Multi Drug Resistance”
MEC	Matriz Extracelular Polimérica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	Ácido Morfolinopropanosulfônico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NGY	<i>Nannizzia gypsea</i>
PBS	Solução Salina Tamponada De Fosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI 1640	“Roswell Park Memorial Institute 1640”
RS	Rio Grande do Sul
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
SIN	Sinérgico
TME	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
TRU	<i>Trichophyton rubrum</i>

TSB	“Tryptic Soy Broth”
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WT	“Wild Type”

1. INTRODUÇÃO

Os casos de pacientes acometidos por infecções fúngicas têm crescido nos últimos anos e os patógenos mais prevalentes são os dermatófitos, tais como *Trichophyton*, *Microsporum* e *Nannizzia*. As micoses superficiais causadas por esse grupo de fungos são doenças altamente contagiosas e acometem os seres humanos, especialmente mulheres grávidas, crianças pequenas, idosos e indivíduos imunocomprometidos.

Além disso, essas infecções fúngicas também são um dos principais motivos de idas de cães em clínicas veterinárias. Fatores como estresse, má nutrição, doenças debilitantes, estado imunológico comprometido e idade jovem são predisponentes. Estima-se que muitos casos de dermatofitoses são de origem de origem zoonótica, transmitidos através do contato direto com animais domésticos.

Embora essas dermatoses não sejam graves em termos de mortalidade e morbidade, causam desconforto substancial aos pacientes. Estima-se que as infecções fúngicas superficiais afetam cerca de 20 a 25% da população mundial e 15% a 20% dos animais domésticos. Por esta razão, é muito importante evitar diagnósticos presuntivos baseados unicamente na aparência de lesões cutâneas visíveis e circulares, garantindo assim, o diagnóstico correto para direcionar um melhor tratamento tanto para o animal quanto para o humano.

As limitadas opções terapêuticas disponíveis no mercado colaboram com o grave problema de resistência aos antifúngicos. Falhas terapêuticas acometem os pacientes ocasionando muitos casos de recidiva, consequência comum quando falado em dermatofitoses. Assim, a necessidade de buscar novas alternativas de tratamento para combater infecções fúngicas torna-se cada vez mais necessária e, portanto, a pesquisa envolvendo associação de agentes antifúngicos é uma abordagem interessante quando a monoterapia não é efetiva. Outra abordagem interessante é a reintrodução de fármacos no tratamento, como o clioquinol, que vem sendo estudado com um importante papel na terapia fúngica.

O clioquinol é um derivado 5,7-dihalogenado da 8-hidroxiquinolina e foi amplamente utilizado entre os anos de 1950 e 1970 como agente antiparasitário sistêmico no tratamento de doenças intestinais, bem como era usado topicamente para tratar infecções de pele. Na década de 70, relatos de neurotoxicidade foram apresentados devido ao uso das formulações orais e, desta forma, esta apresentação foi retirada do mercado. Entretanto, o clioquinol continuou sendo utilizado como

antibiótico tópico. Controvérsias em relação ao caso da neurotoxicidade surgiram e, atualmente, o clioquinol vem sendo amplamente estudado com propriedades biológicas como antifúngica, bactericida e antiproliferativa, bem como, para doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington. Estudos atuais relatam a eficiência frente a isolados de *Candida spp.* e dermatófitos com raros relatos de resistência.

Portanto, o atual cenário de falhas na terapia antifúngica justifica o tema do trabalho, o qual busca novas opções terapêuticas utilizando as estratégias disponíveis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da associação dupla e tripla entre clioquinol com terbinafina e ciclopirox olamina em isolados clínicos de dermatófitos.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar o efeito antifúngico da associação dupla de clioquinol e terbinafina;
- 2.2.2 Avaliar o efeito antifúngico da associação dupla de clioquinol e ciclopirox olamina;
- 2.2.3 Avaliar o efeito antifúngico da associação tripla de clioquinol, terbinafina e ciclopirox olamina;
- 2.2.4 Verificar o potencial toxicológico das combinações sinérgicas dos agentes antifúngicos;
- 2.2.5 Determinar o efeito fungicida ou fungistático das combinações sinérgicas;
- 2.2.6 Averiguar o potencial de irritabilidade das combinações dos fármacos;
- 2.2.7 Verificar a atividade antifúngica das combinações sinérgicas em modelos *ex vivo* de pelo de cachorro e unha suína;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Infecções fúngicas

O número de pessoas no mundo acometidas por alguma infecção fúngica aumentou nos últimos tempos, chegando em torno de 1,2 bilhões. A elevação de casos está relacionada ao aumento de pacientes imunocomprometidos, principalmente àqueles com transplante de órgãos, Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA), câncer e doença autoimune (Chang et al. 2017; Denning e Bromley 2015). Os casos que levam a altas taxas de mortalidade estão frequentemente relacionados com infecções fúngicas invasivas, acometidas por fungos leveduriformes como *Candida* e *Cryptococcus*, e fungos filamentosos, como *Aspergillus*, *Fusarium* ou *Mucor*. (Chang et al. 2017). As infecções causadas por fungos filamentosos dermatófitos, responsáveis pelas micoses cutâneas, são consideradas as mais prevalentes e acometem tanto pacientes imunocomprometidos quanto imunocompetentes (Pires et al. 2014).

3.1.1 Dermatófitos

As micoses cutâneas, causadas principalmente por fungos dermatófitos, estão entre as infecções fúngicas mais comuns em todo o mundo, acometendo diversas faixas etárias e afetando negativamente a qualidade de vida dos pacientes infectados. Embora essas dermatoses não sejam graves em termos de mortalidade e morbidade, causam desconforto substancial aos pacientes. Estima-se que as infecções fúngicas superficiais afetam cerca de 20 a 25% da população mundial (Peres et al. 2010; Pires et al. 2014). Dermatófitos são fungos que invadem e se multiplicam nos tecidos queratinizados (pele, cabelos e unhas) causando infecção muitas vezes com lesões que incluem combinações de alopecia, eritema e pápulas (Bond 2010; Sahoo e Mahajan 2016; Weitzman, Corporis, e Favosa 1995), porém em estado de imunossupressão do hospedeiro, há relatos de dermatofitoses sistêmicas (Lanternier et al. 2013; Marconi et al. 2010; Wu, Sun, e Chang 2013).

3.1.1.1 *Microsporum canis*

Microsporum canis é um fungo zoofílico, sendo considerado o principal agente causador da dermatofitose em animais e em seres humanos no mundo. É conhecido por ser responsável por 15% das infecções fúngicas em humanos em formas localizadas como na *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea pedis* e onicomicose

(Aneke, Otranto, e Cafarchia 2018; Flores et al. 2016; Gupta, Foley, e Versteeg 2017). Essa infecção está frequentemente associada às crianças, principalmente por terem contato direto com animais domésticos como cães e gatos. Nos animais a infecção é frequentemente associada com alopecia multifocal, descamação e lesões circulares, quando não são assintomáticos (Andrade e Rossi 2019; Aneke, Otranto, e Cafarchia 2018).

3.1.1.2 *Nannizzia gypsea*

Nannizzia gypsea (anteriormente classificado como *Microsporum gypseum*) é considerado um fungo geofílico tendo como o seu habitat natural o solo. Por esta razão, não apresenta altos índices de infecções fúngicas (De Hoog et. al, 2016; Souza, Andrade, e Kiszewski 2016). Este fungo é encontrado principalmente em solo contaminado, mas também pode ser encontrado em animais domésticos, como cães e gatos (podendo ser portadores assintomáticos) (Souza, Andrade, e Kiszewski 2016). Quando acomete os seres humanos doentes (principalmente em imunodeprimidos), apresenta como característica lesões clínicas de intensa resposta inflamatória (Flores et al. 2016; Souza, Andrade, e Kiszewski 2016).

3.1.1.3 *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum é o dermatófito mais prevalente em todo o mundo, sendo responsável por 70% das dermatofitoses. É um fungo antropofílico, ou seja, a transmissão é de humano para humano e é considerado o agente mais isolado em onicomicoses (Flores et al. 2016; Nenoff e Ginter 2014). Em pacientes imunocomprometidos, casos já foram relatados em que este agente infeccioso é o principal causador da dermatofitose sistêmica (Huang et al. 2019; Marconi et al. 2010; Wu, Sun, e Chang 2013).

3.1.1.4 *Trichophyton mentagrophytes*

Trichophyton mentagrophytes é considerado um fungo zoofílico, é mais prevalente no âmbito rural e é o agente infeccioso que acomete o maior número de espécies animais (incluindo coelhos, cavalos, porcos e galinhas) (Yu, C., Zhou, J. e Liu, J. 2010). É a segunda espécie dermatofítica mais isolada nos casos de dermatofitoses nos seres humanos causando principalmente *tinea unguium* e *tinea pedis* (Nenoff e Ginter 2014; Sanguino, Jarros e Negri 2019).

3.1.2 Infecções em humanos e animais

Na rotina clínica em animais domésticos, a infecção causada por dermatófitos é considerada a mais prevalente, afetando em torno de 20% dos cães e gatos. Os animais, na maioria das vezes, são portadores assintomáticos de dermatófitos e a espécie predominante é o *M. canis* (Moriello et al. 2017). Pelo menos 30% das infecções por patógenos dermatofíticos em seres humanos são de causa zoonótica (Andrade e Rossi 2019; Moriello et al. 2017). Os sintomas dessa infecção fúngica em animais são os mesmos relatados nos seres humanos, com lesões assimétricas, incluindo perda de pelo, pápulas, escamas, crostas, eritema, hiperpigmentação e alterações na aparência do crescimento das unhas. Normalmente as lesões têm início na face, orelhas e focinho dos animais, e depois tendem a migrar para as patas e outras áreas do corpo. Fatores como estresse, má nutrição, doenças debilitantes, estado imunológico comprometido e idade jovem são predisponentes. (Moriello et al. 2017).

Crianças e adolescentes são frequentemente afetados por dermatofitoses de origem zoonótica, pois a inserção dos animais domésticos dentro das residências, com um contato mais íntimo com o dono tem um grande aumento na transmissão desses dermatófitos. A transmissão da infecção pode ser relacionada com o contato direto ou por conídios espalhados pelo ambiente (Gupta, Foley e Versteeg 2017; Moriello et al. 2017; Nenoff e Ginter 2014).

3.1.3 Biofilme

Uma característica importante que vem sendo muito estudada relacionada às infecções fúngicas é a capacidade de formação de biofilme. Os biofilmes são comunidades microbianas sésseis complexas e estruturadas, organizadas por microrganismos que aderem a uma grande variedade de superfícies e entre si, envoltos por uma matriz extracelular polimérica (MEC). A formação do biofilme fúngico ocorre através de um processo sequencial onde se inicia pela adesão de uma célula planctônica, seguido da colonização, produção da matriz, maturação, e posteriormente a dispersão das células planctônicas para uma nova adesão (Scorzoni et al. 2017).

O biofilme fornece vários benefícios para o patógeno, como resistência a estresses físicos e químicos, comunicação microbiana, aumento da virulência e

disponibilidade de nutrientes (Ramage et al. 2012; Scorzoni et al. 2017). Além disso, alguns fatores associados à formação do biofilme contribuem para o aumento dos casos de resistência e falha na terapia antifúngica, tais como: aumento da densidade celular, uma vez que a suscetibilidade ao agente antifúngico diminuiu conforme aumenta a densidade das células fúngicas; e a MEC, que funciona como uma barreira, diminuindo a quantidade de antifúngico em interação com as células que pertencem ao biofilme, além de fornecer estabilidade mecânica e nutrição (Scorzoni et al. 2017).

Essas características fúngicas já são bem estabelecidas e relatadas em leveduras como *Candida albicans*, a mais comumente encontrada em infecções hospitalares (Nett e Andes 2015; Ramage et al. 2012). Outros fungos leveduriformes como *Candida não-albicans*, *Cryptococcus* e fungos filamentosos como *Aspergillus*, *Fusarium* também tem sido estudados, uma vez que evidências sugerem que a formação do biofilme interfere na resposta terapêutica (Beauvais e Latgé 2015; Nett e Andes 2015; Ramage et al. 2012).

A formação de biofilme em fungos dermatófitos não está muito bem estabelecida, no entanto alguns estudos conseguiram comprovar o processo de biofilme dessas comunidades microbianas em *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (Figura 1) (Costa-Orlandi, Sardi, e Santos 2014; Danielli et al. 2017). As infecções fúngicas por este grupo de patógenos em unhas, pelos e fios de cabelos estão relacionadas principalmente com a formação do biofilme fúngico, sendo correlacionado como importante causa de falha terapêutica (Danielli et al. 2017; Ramage et al. 2012).

Desta forma, é importante avaliar a formação do biofilme em dermatófitos para conseguir estabelecer novos tratamentos que possam controlar esse processo.

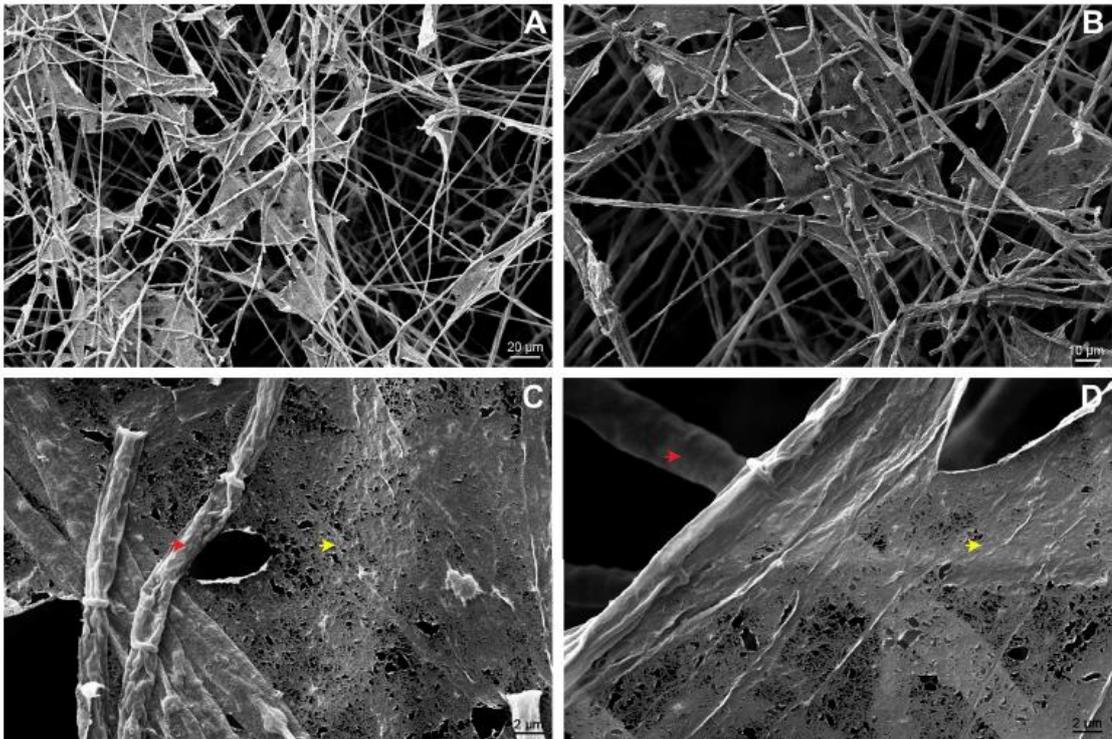


Figura 1. As imagens obtidas pelo MEV (microscopia eletrônica de varredura) demonstram a presença de um micélio tridimensional altamente estruturado, característico do biofilme (A-B), com expansão na forma de uma rede de hifas crescendo em todas as direções (C-D) (adaptado de Danielli et al. 2017). Imagem autorizada pelo autor.

3.2 Terapia antifúngica

O tratamento para dermatofitoses pode ser tanto por uso tópico (auxiliando as lesões mais brandas ou como auxílio ao tratamento sistêmico), quanto por uso sistêmico (utilizado em lesões mais generalizadas, recorrentes, de caráter crônico, ou quando não há resposta à terapia tópica) (D. F. Dalla Lana et al. 2016). Atualmente, cinco principais classes de antifúngicos são conhecidas: azóis, equinocandinas, alilaminas, poliênicos e análogos de pirimidina (Fuentefria et al. 2018) e eles são classificados conforme seu mecanismo de ação, atuando na membrana citoplasmática, parede celular ou síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e proteínas (Figura 2).

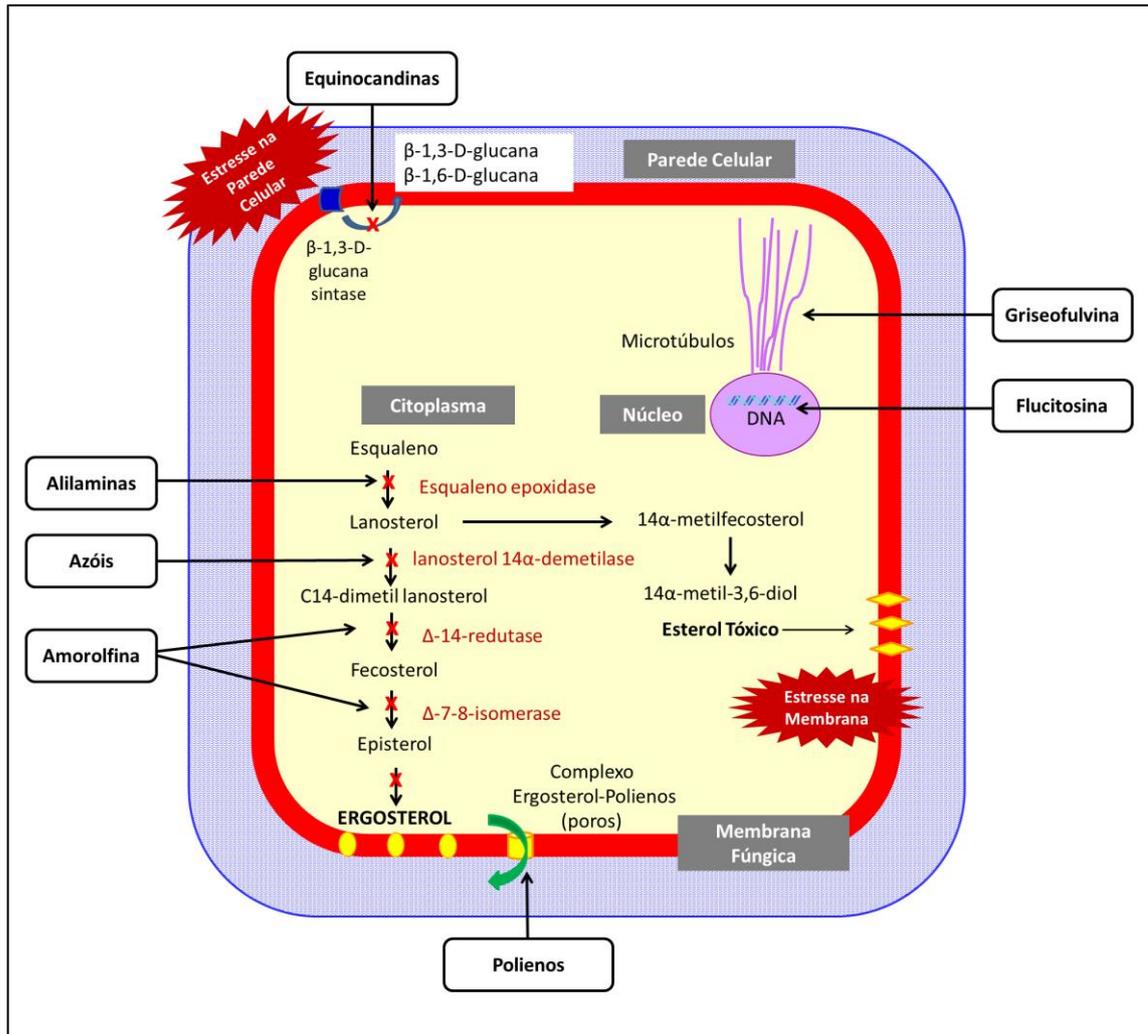


Figura 2. Alvo dos principais antifúngicos (Pippi et al, 2018). Imagem autorizada pelo autor.

3.2.1 Ação sobre o ergosterol

Um dos principais mecanismos antifúngicos é a ação sobre o ergosterol, o qual é um componente da membrana celular fúngica e contribui para funções celulares fundamentais como estrutura, fluidez, integridade da membrana e controle de eventos fisiológicos (Campoy e Adrio 2017; Scorzoni et al. 2017).

3.2.1.1 Azóis

Antifúngicos azólicos são os mais comumente utilizados na clínica, uma vez que são considerados de amplo espectro. Os azóis inibem a enzima lanosterol 14 α -desmetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. Desta forma, há uma interrupção na rota da síntese do ergosterol, tornando a membrana desestabilizada, alterando a permeabilidade e a ação de enzimas ligadas à membrana, uma vez que o ergosterol é o principal constituinte. Também há um

acúmulo de intermediários esteróis como: 14-metilados (precursores do ergosterol) os quais são tóxicos para as células fúngicas (Campoy e Adrio 2017; Chang et al. 2017; Cowen et al. 2015; Revie et al. 2018).

Esta classe apresenta dois grandes grupos: os imidazóis (com um átomo de nitrogênio) e os triazóis (com três átomos de nitrogênio). Os imidazóis formam a primeira geração dos azóis e são representados por miconazol e cetoconazol. Devido a sua elevada toxicidade e aos efeitos colaterais, foram substituídos pelos triazóis (Campoy e Adrio 2017). Os triazóis, como itraconazol e fluconazol, 1ª geração dos triazóis, apresentam uma atividade antifúngica com maior espectro de ação e redução dos efeitos adversos e, portanto, são os mais utilizados rotineiramente na terapia antifúngica, tanto em animais como em humanos (Campoy e Adrio 2017; Moriello et al. 2017).

O uso indiscriminado dessa classe, com a alta incidência de resistência à terapia fúngica, levou ao surgimento da 2ª geração dos triazóis, composta por voriconazol e posaconazol, que teve como objetivo a melhoria dos efeitos farmacocinéticos e espectro de ação. Porém, ainda restrito ao uso humano (Chang et al. 2017).

3.2.1.2 Alilaminas

As alilaminas, tendo a terbinafina como principal representante, inibem reversivelmente a enzima esqualeno epoxidase (codificada pelo gene ERG1) e são considerados agentes fungicidas. Essa classe bloqueia a biossíntese do ergosterol, levando ao acúmulo de quantidades tóxicas de esqualeno, aumento da permeabilidade da membrana e desorganização da célula fúngica (Campoy e Adrio 2017). É uma classe de agentes antifúngicos muito utilizada para tratamento sistêmico de dermatófitos em animais e humanos, uma vez que a terbinafina tem afinidade pela queratina e desta forma se acumula em pele, unha, cabelos e pelos e no tecido adiposo (Campoy e Adrio 2017; Cowen et al. 2015; Moriello et al. 2017).

3.2.1.3 Poliênicos

São moléculas de amplo espectro, representadas pela anfotericina B e natamicina. Por apresentarem característica anfifílica, essas moléculas se complexam com o ergosterol presente na bicamada lipídica formando poros. Uma vez que esses poros são formados, promovem a ruptura da membrana e o extravasamento do

conteúdo citoplasmático resultando na morte celular (Campoy e Adrio 2017; Chang et al. 2017).

Anfotericina B apresenta uma pequena afinidade pelo colesterol de membrana da célula humana e esta característica explica a alta toxicidade, principalmente em relação aos rins e fígado. Tem como grande desvantagem a baixa biodisponibilidade associado com baixa absorção gastrointestinal (Kristanc, Božič, e Jokhadar 2018).

3.2.1.4 Morfolinas

A amorolfina, representante da classe, é um derivado da morfolina. Essa classe de agentes antifúngicos possui efeito fungicida e fungistático. Está envolvido com a inibição de duas enzimas envolvidas na síntese do ergosterol Δ -7-8-isomerase e Δ -14-redutase. É restrita ao uso tópico para tratamento de dermatofitoses, principalmente as onicomicoses, devido aos efeitos adversos (Campoy e Adrio 2017).

3.2.2 Inibidores da síntese da β -1,3-d-glicana sintase

A parede celular fúngica é composta de glicanas [polissacarídeos constituídos de monômeros de D-glicose em ligações β -(1,3) ou β -(1,6) glicanas], e a β -1,3-glicana sintase é a principal componente que garante a estrutura da parede celular. Uma vez inibida a síntese deste polissacarídeo, instabilidade osmótica e morte de células fúngicas são esperadas, visto que ocorre a ruptura da estrutura da parede celular em desenvolvimento (Campoy e Adrio 2017; Patil 2017).

3.2.2.1 Equinocandinas

As equinocandinas são a última classe descoberta de antifúngicos. Elas têm como alvo a parede celular fúngica, inibindo não competitivamente a β -1,3-D-glicana sintase que leva à desestabilização da parede celular, com instabilidade osmótica, perda da integridade da parede celular e lise das células fúngicas (Campoy e Adrio 2017).

Essa classe é composta por caspofungina, micafungica e anidulafungina. Apresentam como vantagem a especificidade pela parede celular fúngica uma vez que as células dos mamíferos não possuem parede (Chang et al. 2017; Patil and Majumdar 2017; Revie et al. 2018). Essa característica faz com que esta classe tenha os efeitos adversos reduzidos e baixa toxicidade em comparação com as outras

terapias disponíveis (Campoy e Adrio 2017; Patil 2017).

Entretanto, as equinocandinas, por apresentarem alto peso molecular, não tem uma boa biodisponibilidade oral e estão disponíveis no mercado apenas por via intravenosa e, dessa forma, seu uso fica restrito a ambiente hospitalar (Campoy e Adrio 2017; Patil 2017). Essa classe é muito utilizada para tratamentos de candidemias e não é indicada para o tratamento de *Cryptococcus*, *Trichophyton* e *Fusarium* (Chang et al. 2017).

3.2.3 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

3.2.3.1 Fluocitosina

Esta classe de antifúngicos tem a molécula de fluocitosina (5-fluorocitosina) como um análogo de pirimidina fluorada, com atividade fungistática. Há uma interferência no metabolismo da pirimidina, inibindo competitivamente a timidilato-sintase e, como consequência, inibe a síntese de DNA, RNA e proteínas. A fluocitosina é eficaz para infecções fúngicas causadas por *Candida* e *Cryptococcus*, uma vez que estes gêneros possuem a enzima timidilato sintase, sendo restrito então para leveduras patogênicas (Campoy e Adrio 2017; Scorzoni et al. 2017).

3.2.4 Inibidores da biossíntese de microtúbulos

Microtúbulos são estruturas proteicas de dímeros de tubulina α e β que fazem parte do citoesqueleto, altamente organizados, em todas as células eucarióticas (Campoy e Adrio 2017).

3.2.4.1 Griseofulvina

Esse agente antifúngico é um dos mais antigos disponíveis no mercado e tem o seu uso restrito aos dermatófitos. A griseofulvina interfere na divisão celular rompendo os fusos mitóticos, ao interagir com a rede de tubulina, afetando então, na montagem dos microtúbulos. Ela também inibe a síntese de ácidos nucleicos (Campoy e Adrio 2017). Apresenta mais efeitos colaterais em comparação ao itraconazol e terbinafina, como elevada hepatotoxicidade (Moriello et al. 2017).

3.2.5 Outros mecanismos

3.2.5.1 Ciclopirox olamina

O ciclopirox olamina é uma hidroxipiridona e seu mecanismo de ação não

é completamente elucidado. Por apresentar afinidade por cátions trivalentes (Fe^{3+}), ele atua inibindo enzimas dependentes de metais. Além disso, afeta a produção de energia no transporte de elétrons nas mitocôndrias, a captação de nutrientes e a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Devido aos seus múltiplos mecanismos de ação, o ciclopirox olamina é considerado fungicida (Gupta, Paquet e Simpson 2013). Este fármaco é muito utilizado para tratamento de onicomicoses e está disponível para utilização em tratamento tópico, em forma de esmalte, creme e solução tópica (Gupta, Foley e Versteeg 2017; Gupta, Paquet e Simpson 2013).

3.3 Resistência aos antifúngicos

A falha terapêutica é um problema para a terapia antifúngica, uma vez que poucos medicamentos em uma quantidade limitada de classes estão disponíveis no mercado. Além disso, infecções fúngicas relacionadas com dermatófitos podem apresentar algumas complicações relacionadas com o longo período de tratamento, uma vez que esses fármacos apresentam alta toxicidade, baixa tolerância a altas doses de antifúngicos, efeitos colaterais indesejados e baixo espectro de atividade (Campoy e Adrio 2017; Chang et al. 2017; Fuentesfria et al. 2018).

Os termos "resistência" e "recidiva" estão relacionados frequentemente na resposta clínica do tratamento de dermatofitoses. Alguns fatores que contribuem para este cenário são reconhecidos na literatura como adaptabilidade do patógeno de sobreviver no organismo, variação na suscetibilidade frente aos agentes antifúngicos e a resposta imune do hospedeiro (Khurana, Sardana e Chowdhary 2019). Além disso, a formação do biofilme é uma das principais razões para a resistência aos antifúngicos (Khurana, Sardana e Chowdhary 2019; Scorzoni et al. 2017).

Diferentes mecanismos de resistência aos antifúngicos já foram descobertos, entretanto alguns são mais prevalentes para os dermatófitos e são considerados de acordo com as classes dos fármacos (Khurana, Sardana e Chowdhary 2019). Os principais antifúngicos utilizados no tratamento das dermatofitoses, tanto em humanos quanto em animais, são terbinafina, ciclopirox olamina olamina, griseofulvina e itraconazol (A. J. Dalla Lana et al. 2018; Moriello et al. 2017; Pires et al. 2014; White et al. 2014).

A classe dos azóis é a mais amplamente estudada, visto que são antifúngicos de amplo espectro, utilizados numa variedade de infecções fúngicas.

Dentre os mecanismos de resistência conhecidos estão: i) mutação da enzima alvo - a afinidade entre fármaco e enzima é reduzida, diminuindo as ligações; ii) superexpressão da enzima alvo - a biossíntese do ergosterol se torna possível mesmo com a presença do fármaco, permanecendo viável a célula fúngica; iii) superexpressão das bombas de efluxo - resulta na expulsão do fármaco da célula fúngica e como consequência diminui a sua concentração no local de ação; iv) alteração de outras enzimas da via da biossíntese do ergosterol - pode ocorrer acúmulo de esteróis não tóxicos que substituem o ergosterol da membrana da célula fúngica (Fuentefria et al. 2018; Khurana, Sardana e Chowdhary 2019; Scorzoni et al. 2017).

Por outro lado, a resistência nas alilaminas frente aos dermatófitos tem poucos casos relatados e os mecanismos são frequentemente relacionados com as bombas de efluxo (Scorzoni et al. 2017). Casos de falha terapêutica tem aumentado, uma vez que a terbinafina tem sido muito utilizada no tratamento prolongado de onicomicose e no tratamento local de dermatofitose sem supervisão adequada, principalmente em países que não tem a regulamentação da compra de antifúngicos, ocasionando as falhas clínicas (Khurana, Sardana e Chowdhary 2019).

A respeito da griseofulvina, primeiro antifúngico sistêmico introduzido na dermatofitose, não se conhece o mecanismo envolvido na resistência, entretanto, já foi descrito uma expressão aumentada de MDR1 ("Multi Drug Resistance" 1, uma glicoproteína-P transportadora de membrana) que leva a um aumento nas bombas de efluxo (Khurana, Sardana, e Chowdhary 2019).

3.4 Opções de combate à resistência

Novas alternativas terapêuticas vêm sendo adotadas para o combate da resistência e recidiva dessas infecções fúngicas, como exemplo: a reintrodução de fármacos em desuso no mercado com novo objetivo terapêutico e a terapia combinada (Fuentefria et al. 2018).

O clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina), é uma 8-hidroxiquinolina di-halogenada que foi amplamente utilizada na medicina humana entre as décadas de 1950 a 1970 como agente antiparasitário oral e para infecções da pele. Nos anos 70, a apresentação oral foi retirada do mercado devido a relatos de neurotoxicidade em pacientes japoneses. No entanto, formulações tópicas de clioquinol ainda estão disponíveis (Mao e Schimmer 2008). Propriedades biológicas como antifúngica,

bactericida e antiproliferativa foram relatadas para o clioquinol e outros derivados da 8-hidroxiquinolina (Oliveri e Vecchio 2016). Ainda, estudos atuais mostraram que o clioquinol inibe efetivamente o crescimento de *Candida* spp. e dermatófitos com raros relatos de resistência (Pippi et al. 2017).

As terapias combinadas estão sendo usadas clinicamente como estratégia terapêutica na ausência de monoterapia efetiva (Fuentefria et al. 2018). A combinação dupla de itraconazol e terbinafina foi descrita como efetiva para fungos dermatófitos (Sharma et al. 2019). Tamura et al (2014) relataram combinações sinérgicas para dermatófitos quando combinado amorolfina e itraconazol. Da mesma forma, Laurent e Monod (2017) também relataram efeito sinérgico de amorolfina com derivados azólicos. Estudos mostram o potencial da combinação tripla em tratamentos como descrito por Tascini et al (2003), onde é relatado a efetividade de caspofungina, terbinafina e anfotericina no tratamento de aspergilose invasiva. Entretanto a combinação tripla para dermatófitos ainda não foi descrita na literatura.

Os potenciais benefícios da terapia combinada com antifúngicos incluem: superação da resistência fúngica, expansão do espectro de ação, melhora da eficácia clínica dos medicamentos e redução das doses administradas, o que resulta em menor toxicidade e diminuição dos efeitos colaterais no hospedeiro (Fuentefria et al. 2018; Hatipoglu e Hatipoglu 2013; Shrestha, Fosso, e Garneau-Tsodikova 2015).

3.5 Modelos alternativos

Após a triagem inicial em experimentos *in vitro*, é necessário a utilização de modelos *in vivo* para que os resultados possam ser confirmados em sistemas complexos. Os modelos mamíferos são considerados o modelo ideal para realizar os testes toxicológicos, terapêuticos e a resposta imune aos fármacos (Scorzoni et al. 2017). Os princípios fundamentais ao uso de animais e alternativas foram estabelecidos por Russell e Burch, em 1959, através dos 3Rs: reposicionamento, redução e refinamento (Clark et al. 2017; Lossi e Merighi 2018). Na perspectiva de reduzir e refinar o uso desses animais na pesquisa, a utilização de modelos alternativos vem sendo estudados e utilizados como triagem para posterior testes em mamíferos (Lossi e Merighi 2018).

3.5.1 Modelos alternativos ex vivo

Diversos trabalhos tem estudado a atividade antifúngica de novos

compostos, bem como a associação de agentes. Entretanto, após avaliação *in vitro*, testes *ex vivo* são alternativas importantes para dar seguimento à avaliação antifúngica, uma vez que assemelham-se à experimentos *in vivo*, mas tem a capacidade de preservar parcialmente a estrutura tridimensional do tecido e os diferentes tipos de células que podem estar presentes (Lossi e Merighi 2018; Quatrin et al. 2019; Scorzoni et al. 2017).

O termo *ex vivo* é empregado quando se utiliza tecidos removidos de um organismo *in vivo*, com a aplicação em experimentos que serão realizados em ambiente artificial (ou seja, um fragmento de tecido ou órgão é extraído do corpo do animal e mantido em cultura). (Quatrin et al. 2019; Ohnemus et al. 2007). Cabe ressaltar que o animal não é morto com a finalidade do experimento *ex vivo*; na maioria dos casos, são fragmentos de tecidos que estariam sendo rejeitados, sem valor comercial, e que são aproveitados para a realização dos experimentos.

Diversos tecidos tem sido utilizados como modelos *ex vivo* para avaliação da ação antifúngica, tais como: modelo de infecção em mucosas utilizando mucosa oral de ratos a fim de avaliar a eficácia do tratamento antifúngico para candidíase oral (Labib e Aldawsari 2015); infecção em córnea, com a utilização de córneas humanas doadas, onde, após a infecção, é avaliado o sucesso da terapia frente às ceratites (Alshehri et al. 2016); infecção no tecido respiratório, onde tecidos pulmonares são utilizados para avaliar a eficácia das formulações antifúngicas frente ao sistema respiratório (Hashemi et al. 2018). Alguns modelos alternativos *ex vivo* que serão alvo em nossa pesquisa serão enfatizados a seguir:

3.5.1.1 Modelo de infecção em unha

Para avaliar o sucesso da terapia antifúngica em onicomicose, unhas suínas podem ser utilizadas como um método alternativo *ex vivo*. Estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizou casco suíno em experimentos para avaliação da atividade antifúngica, uma vez que esse tecido apresenta uma matriz de queratina semelhante à estrutura da unha humana (Quatrin et al. 2019).

3.5.1.2 Modelo de infecção em pelo

A utilização de pelos de origem animal ou cabelos humanos também é considerado um modelo *ex vivo*. Desta maneira, é possível investigar o sucesso da terapia em infecções de cabelos e pelos frente aos patógenos mais comumente

causadores de infecções, como, por exemplo, os fungos dermatófitos (Al-janabi et al. 2016).

3.5.1.3 Modelo de avaliação da toxicidade em pele

Outro modelo *ex vivo* muito empregado é a pele de orelha suína. Através desse modelo é possível observar o dano tecidual gerado pela utilização da terapia tópica através de ensaios histopatológicos (Nair et al. 2016).

3.5.2 Modelos alternativos *in vivo*

A utilização de modelos alternativos *in vivo* tem sido bastante explorada no seguimento das pesquisas de fármacos. Esses modelos são bastantes explorados uma vez que sistemas neurais de alguns animais não mamíferos são pouco desenvolvidos e, desta forma, não apresentam dor. Além disso, pode-se utilizar um grande número de animais no experimento com baixo valor de manutenção e, ainda, é comprovado que apresentam uma boa correlação com os mamíferos (Scorzoni et al. 2017).

Modelos de vertebrados inferiores, como peixe-zebra (*Danio rerio*) são bastante utilizados como um modelo de toxicidade e teratogênese. O peixe-zebra deve ser usado em estudos de toxicidade sistêmica aguda e crônica e de órgãos específicos (Racz et al. 2017; Scorzoni et al. 2016). Os modelos de invertebrados como *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans* também são frequentemente utilizados para avaliação toxicológica de fármacos, reduzindo assim a probabilidade de uma nova combinação de fármacos ou novos compostos com atividade *in vitro* avançar aos modelos de mamíferos e falhar (Singulani et al. 2018). Alguns modelos alternativos *in vivo* que serão alvo em nossa pesquisa serão enfatizados a seguir:

3.5.2.1 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster é um inseto conhecido como mosca-das-frutas. É um animal que vem sendo bastante estudado como modelo alternativo de infecção sistêmica, com investigações da virulência de agentes patogênicos humanos a também eficácia de novas combinações e compostos antifúngicos (Scorzoni et al. 2017).

As moscas *D. melanogaster* não apresentam um sistema imune adaptativo,

porém possuem uma primeira linha de defesa semelhante aos mamíferos, podendo ser considerada como uma resposta imune inata. Já foi relatado que moscas *D. melanogaster* possuem duas vias de sinalização conservadas que são ativadas durante as respostas imunes frente às infecções: imd e Toll. A via Toll é considerada como crítica para a proteção de *D. melanogaster* contra fungos e as mutações nesta via levam à morte das moscas rapidamente. Desta forma, as *D. melanogaster* mutantes Toll-deficientes são bastante interessantes em modelos de infecção por fungos, não só por oferecem a vantagem de poderem ser cultivadas, manipuladas e analisadas em grandes números com significativamente menos trabalho, mas também por mimetizarem a imunodeficiência, sendo uma condição para o estabelecimento de diversas doenças fúngicas sistêmicas (Lionakis et al. 2005).

3.5.2.2 Embriões de galinha

Outro modelo alternativo *in vivo* amplamente utilizado é o embrião de galinha, uma vez que é de fácil manuseio, rápido desenvolvimento, embriogênese acelerada e sensibilidade elevada às substâncias. Os embriões de galinha crescem sob condições controladas e pequenas variações resultam em desenvolvimento anormal ou morte (Betsabee et al 2016; Scorzoni et al. 2017).

As características descritas tornam o modelo altamente desejável em estudos de toxicidade, pois qualquer alteração no ambiente de experimento oferece respostas imediatas aos efeitos tóxicos das substâncias em estudo (Betsabee et al. 2016; Oliveira et al. 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e seleção dos microrganismos:

Neste estudo, foram incluídos três isolados das espécies de fungos dermatofíticos mais prevalentes: *M. canis*, *N. gypsea*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, totalizando, assim, 12 isolados fúngicos. Os isolados estão depositados e registrados na micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada (GPMA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os ensaios e avaliações microbiológicas *in vitro* e *ex vivo*, bem como os ensaios de toxicidade, foram conduzidos no laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS. Os ensaios *in vivo* com *D. melanogaster* foram realizados no Drosolab do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da mesma instituição. Por fim, os testes de irritabilidade em embriões de galinha e toxicidade dérmica foram realizados no Laboratório de Farmacologia pertencente ao Instituto Federal Catarinense (IFC) de Concórdia, SC.

4.2 Agentes Antifúngicos:

Os agentes antifúngicos utilizados neste estudo foram preparados de acordo com as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). As soluções estoque para o clioquinol (Sigma-Aldrich, EUA), ciclopirox olamina (Sigma-Aldrich, EUA) e terbinafina (Sigma-Aldrich, EUA) (Figura 3) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich). Para os experimentos, os compostos foram diluídos em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640; Gibco, Nova York) - sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico; Sigma-Aldrich) e ajustado para pH 7,0 - obtendo uma concentração máxima de 1% de DMSO.

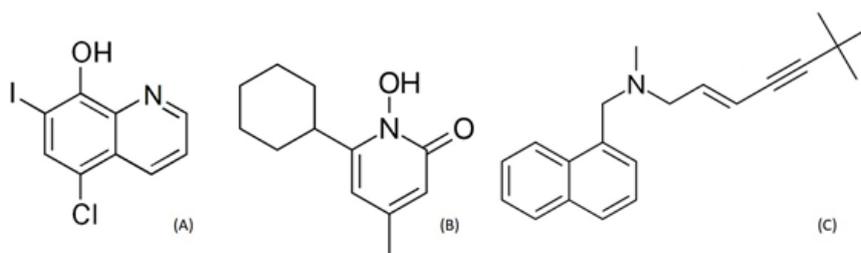


Figura 3. Estrutura química do clioquinol (A), ciclopirox olamina (B) e terbinafina (C).

4.3 Teste de suscetibilidade aos agentes antifúngicos:

O teste de suscetibilidade foi realizado com clioquinol, terbinafina e ciclopirox olamina. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas

pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M38-A2 (CLSI, 2008), estabelecida para fungos filamentosos, em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços.

O inóculo fúngico dos dermatófitos foi feito a partir do crescimento em tubos contendo ágar BDA (agar de dextrose de batata, Kasvi), incubadas na temperatura de 32°C durante 7 dias. Uma solução salina 0,85% estéril foi adicionada nas colônias e posteriormente foram friccionadas para a obtenção dos esporos. A suspensão fúngica resultante foi ajustada em RPMI 1640 a fim de obter 2 a 6 x 10³ UFC /mL

Os agentes antifúngicos passaram por uma diluição em série em meio RPMI e, logo após, o inóculo fúngico preparado foi adicionado. A CIM é estabelecida pela observação da inibição de 100% do crescimento visível do fungo após 96h de incubação a 32°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Avaliação da interação dupla e tripla dos agentes antifúngicos (Checkerboard):

No ensaio da associação dupla, a interação entre os antifúngicos clioquinol com o ciclopirox olamina e com a terbinafina foi avaliada conforme o protocolo estabelecido por Johnson et al. (2004). As concentrações testadas de cada agente antifúngico foram: CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8, totalizando 49 combinações de concentrações. Os experimentos foram realizados em triplicata e incubados por 5 dias a 32°C. O sinergismo foi estabelecido quando o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) apresentou resultados inferiores a 0,5; indiferente quando 0,5 < ICIF ≤ 4; e antagonismo quando ICIF > 4 (Odds 2003).

No ensaio da associação tripla, avaliou-se a combinação entre os três antifúngicos conforme o protocolo estabelecido por Stein et al. (2015). As concentrações variaram entre: CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM até CIMx2 estabelecendo um total de 125 combinações de concentrações. Os experimentos seguiram as mesmas condições do sinergismo duplo. O sinergismo foi estabelecido quando o ICIF apresentou os resultados inferiores a 0,75; indiferente quando 0,75 < ICIF ≤ 4; e antagonismo quando ICIF > 4 (O'Shaughnessy et al. 2006).

4.5 Ensaio do tempo de morte:

Um isolado representativo que obteve resultados sinérgicos para as combinações duplas e tripla foi utilizada neste ensaio (*T. rubrum* - TRU47). O inóculo

fúngico foi exposto a diferentes combinações das associações dos antifúngicos conforme descrito por Ghannoum et al. (2013) com o objetivo de determinar o efeito fungicida ou fungistático. As concentrações testadas foram: CIMs de cada antifúngico; CIMs de cada fármaco sozinho encontradas nas combinações duplas e triplas; e as combinações sinérgicas (duplas e triplas). Além disso, em paralelo, um controle sem tratamento também foi avaliado.

Nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h, alíquotas foram retiradas, submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em ágar sabouraud dextrose (SDA) para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Curvas das UFC/mL em função do tempo foram construídas e os tratamentos comparados com a suspensão fúngica que não recebeu nenhum tratamento. Nos casos das combinações, as associações também foram comparadas aos agentes antifúngicos sozinhos.

O efeito fungicida foi considerado quando houve redução de crescimento $\geq 99,9\%$ comparadas ao inóculo inicial. Caso contrário, as combinações foram consideradas fungistáticas. A análise estatística foi realizada com ANOVA de duas vias, bem como com o teste de comparações múltiplas de Turkey (software GraphPad Prism; versão 6.0;). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.6 Avaliação da Toxicidade:

A citotoxicidade das combinações e dos agentes antifúngicos foi determinada através da avaliação da viabilidade celular pela perda de integridade da membrana de leucócitos usando o corante azul de tripano (Newprov, Brasil) de acordo com Burow et al. (1998). As concentrações testadas foram: CIMs de cada antifúngico; CIMs de cada fármaco sozinho encontradas nas combinações duplas e triplas e as combinações sinérgicas (duplas e triplas) encontradas para o isolado *T. rubrum* TRU47. O método utiliza leucócitos que são submetidos ao reagente Turk (Newprov, Brasil) e uma alíquota é visualizada na câmara de Neubauer em microscópio óptico (Kasvi, Brasil) com ampliação de 400X. As células mortas adquirem coloração azul, diferentemente das células vivas. Um total de 300 células foram contadas e posteriormente foi estabelecido a porcentagem de células viáveis. A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via, bem como com o teste de comparações múltiplas de Turkey (software GraphPad Prism; versão 6.0;). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.7 Avaliação do potencial de irritabilidade:

Para avaliar o potencial irritativo das combinações dos agentes antifúngicos, foi utilizado o método alternativo HET-CAM (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane). O método foi descrito anteriormente por Oliveira et al. (2012) baseando-se nas alterações macroscópicas que podem ocorrer na membrana corioalantoide de ovo embrionado de galinha. Para tal avaliação, ovos brancos férteis e frescos, do tipo comercial Lohmann (Lohmann selected Leghorn, LSL, Brasil) foram utilizados. Os ovos foram mantidos em condições de incubação otimizadas (temperatura entre 38 - 39°C e umidade entre 55 – 60%, durante 10 dias). No décimo dia, a casca do ovo, ao redor do espaço aéreo, foi cuidadosamente removida com uma ferramenta rotativa (Dremel, Racine WI). Em seguida, foram adicionados 0,3 mL de cada solução em cada ovo [controle negativo - solução salina 0,9%; controle positivo - solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M; combinação dupla de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL), combinação dupla de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL); e a combinação tripla de clioquinol (0,125 µg / mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg / mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL)].

Durante períodos pré-determinados (30 segundos, 2 minutos e 5 minutos) após a aplicação de cada substância, a membrana corioalantoide foi examinada e as reações fisiológicas observadas foram graduadas em função de seu tempo de aparecimento. O resultado do índice de irritação (II) foi dado de acordo com tempo de hemorragia, tempo de lise e tempo de coagulação e classificado em não irritante (0 a 4,9) ou irritante (5 a 21), conforme a equação 1 (ICCVMA, 2010).

$$II = \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de hemorragia})}{300} \right) x 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de lise})}{300} \right) x 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de coagulação})}{300} \right) x 9 \right) \quad (1)$$

A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via, bem como com o teste de comparações múltiplas de Dunnett's (software GraphPad Prism; versão 6.0;). P <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.8 Determinação histopatológica em pele suína:

Para verificar o possível dano tecidual devido à ação das associações dos

antifúngicos, orelhas de suínos passaram por uma avaliação histopatológica. Amostras de tecido de suínos machos adultos, recém abatidos no Instituto Federal de Santa Catarina - campus Concórdia, foram utilizadas para avaliar a formação de danos nos tecidos devido à ação das combinações do clioquinol, ciclopirox olamina e terbinafina. Os suínos foram abatidos de acordo com as regras do Ministério da Agricultura, respeitando o bem-estar animal (Brasil, 2013). A pele da orelha de suínos foi utilizada neste estudo. Os tecidos foram removidos dentro de um período de 5 minutos após o abate; os pelos foram cuidadosamente removidos por um aparador elétrico e a pele transportada para o laboratório em tampão Krebs-Hepes resfriado. As amostras de pele foram montadas em células de difusão Franz (Logan Instrument Corp., NJ) com a área de difusão de aproximadamente 1,75 cm². O lado epidérmico da pele foi exposto a uma solução salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,0 (controle negativo) e uma solução de NaOH 0,1 M (controle positivo) por um período de 6 horas. A combinação dupla de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL), a combinação dupla de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL) e a combinação tripla de clioquinol (0,125 µg / mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg / mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) foram utilizadas neste teste. O lado epidérmico da pele foi submetido à extração de contato com esta solução por um período de 6 horas. Os fragmentos desses tecidos foram coletados, fixados em formalina tamponada neutra a 10%, processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (HE) (Laborclin, Brasil) e então, examinados sob microscopia óptica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9 Avaliação da atividade antifúngica combinada em modelos *ex vivo*: unha e pelo

4.9.1 Avaliação em unha de suínos:

Para a avaliação da atividade das combinações dos agentes antifúngicos em queratina, cascos suínos foram utilizados (Figura 4). As soluções das combinações de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL), a combinação dupla de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL) e a combinação tripla de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) foram incorporadas em uma base de esmalte para unhas (nitrocelulose, tolueno sulfonamida, acetato de etila, acetato de butila, óleo de mamona, álcool isopropílico e dimeticona) produzida pela Bonatto Ind. Ltda

(Cachoeirinha, Brasil). O inóculo fúngico foi preparado a partir do isolado *T. rubrum* TRU47 e 100 µL da suspensão fúngica (10^5 UFC/mL) foram inoculados em uma placa de Petri contendo BDA, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Os cascos suínos foram cortados em formato de discos com espessura de 1 mm, esterilizados, e, então, adicionados nas placas com ajuda de uma pinça. Após o período de infecção (cinco dias), os cascos foram transferidos para uma placa contendo SDA, onde o tratamento foi iniciado adicionando diariamente, por sete dias, em cada disco suíno, um volume suficiente de esmalte contendo o agente antifúngico para cobrir o material (20 µL).

Ao final dos sete dias, os discos de cascos foram transferidos para tubos contendo 2 mL de solução salina e então, levados ao vórtex (1 minuto) e ao sonicador (20 minutos) para remover as células fúngicas aderidas aos discos (Etapa 1). Uma alíquota dessa suspensão foi diluída em série e plaqueada em ágar batata, com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 32°C por aproximadamente sete dias para posterior contagem das UFC. Os experimentos foram realizados em triplicata (Quatrin et al. 2020).

A verificação de células fúngicas viáveis que permanecerem no interior dos cascos suínos também foi feita através das UFC. Para isso, os discos suínos que passaram pelo tratamento foram novamente incubados em placas de SDA e acompanhados por até sete dias para nova verificação de crescimento visível do fungo (Etapa 2). A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey (software GraphPad Prism; versão 6.0;). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.9.2 Avaliação em pelo de origem animal:

Foi realizado a avaliação da eficácia da proteção e remoção do biofilme fúngico das combinações dos antifúngicos frente ao pelo de origem animal (de cachorro, da raça akita) (Figura 5). A combinação dupla de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL), a combinação dupla de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL) e a combinação tripla de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) foram utilizadas nestes ensaios.

4.9.2.1 Avaliação da inibição da formação de biofilme:

Na avaliação da inibição da formação de biofilme, pelos de animais padronizados em 3 cm foram pré-tratados com as combinações dos agentes

antifúngicos por 15 minutos e então foram incubados em 4,5 mL de TSB com 0,5 µL de inóculo fúngico de *M. canis* (MCA29), obtendo uma suspensão de 10⁷ células/mL, por cinco dias. Após este período, os pelos foram lavados com água e colocados em um falcon contendo 5 mL de água destilada e, posteriormente, levado ao vórtex por 1 minuto e depois sonicado por 20 minutos para remover as células fúngicas aderidas.

Os experimentos foram realizados em triplicata. Um controle não tratado, contendo somente o inóculo fúngico, foi realizado. Uma alíquota de 20 µl das suspensões sonicadas foi colocada em placa SDA e espalhado com auxílio da alça de Drigalski. Ao final do período de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.9.2.2 Avaliação da erradicação do biofilme:

A erradicação do biofilme frente às formulações também foi avaliada. Para isso, foi realizado a formação do biofilme em outros pelos com 4,5 mL de TSB e 0,5 µL de inóculo fúngico de *M. canis* (MCA29), obtendo uma suspensão de 10⁷ células/mL, por cinco dias. Após o período de infecção, os pelos foram lavados com água e tratados com as formulações por 15 minutos. Os pelos então foram lavados com água e colocados em um tubo Falcon contendo 5mL de água destilada e, posteriormente, levados ao vórtex por 1 minuto e depois sonicados por 20 minutos para remover as células fúngicas aderidas.

Os experimentos foram realizados em triplicata. Um controle não tratado, contendo somente o inóculo fúngico, foi realizado. Uma alíquota de 20 µl das suspensões sonicadas foi colocada em placa SDA e espalhado com auxílio da alça de Drigalski. Ao final do período de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A porcentagem de inibição e de erradicação do biofilme foi calculada conforme a equação 2:

$$\text{Inibição ou Erradicação (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{UFC tratamento} \times 100\%}{\text{UFC controle}} \right) \quad 2)$$

A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via, bem como com o teste de comparações múltiplas de Turkey (software Minitab®; versão 19.2). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante.



Figura 4. Esquema das etapas do teste de ação antifúngica sobre modelo de onicomicose em cascos suínos (Costa, 2020).

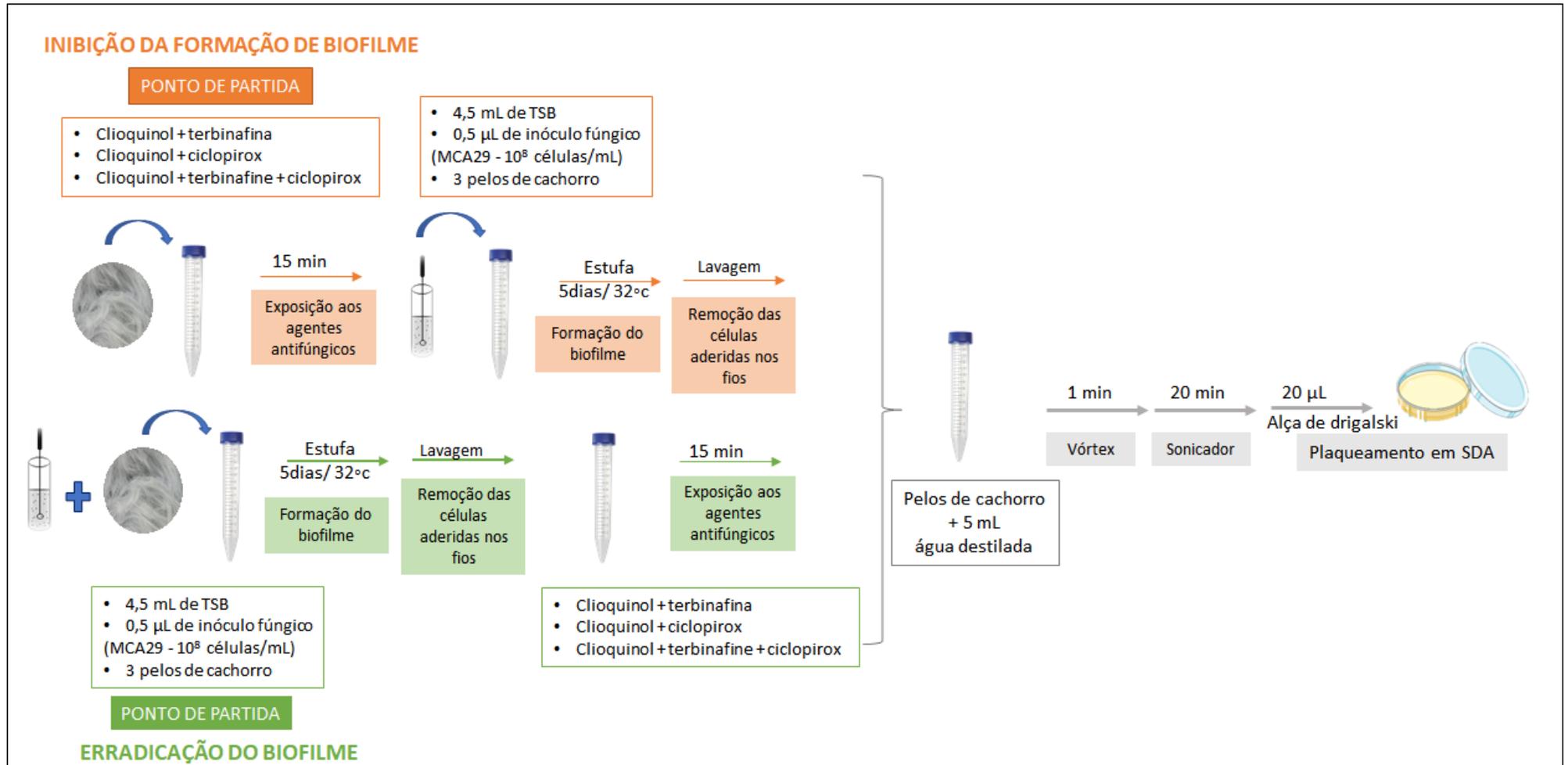


Figura 5. Esquema das etapas do teste de ação antifúngica sobre biofilme formado em pelos de origem animal (Costa, 2020).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos no sinergismo duplo e triplo são apresentados na Tabela 1. A interação sinérgica foi observada em 42% dos isolados quando a terbinafina foi associada ao clioquinol e em 50% dos isolados quando o ciclopirox olamina foi associado ao clioquinol. A associação tripla resultou em uma interação sinérgica para 75% dos isolados e nenhum caso de antagonismo foi observado. Apenas o isolado TRU47 obteve efeito sinérgico em todas as combinações testadas, sendo este isolado escolhido para o ensaio de tempo de morte.

Os agentes antifúngicos (CIM) e as associações duplas e triplas exibiram um efeito fungicida dependente do tempo para o isolado TRU47 testado, como mostrado na Figura 6. O clioquinol (CIM: 1,0 µg/mL) apresentou efeito fungicida (redução > 99,9% na UFC) às 96 h, terbinafina (CIM: 0,25 µg/mL) às 72h e ciclopirox olamina (MIC: 2 µg/mL) às 120 h. Para a combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) e combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL), esse efeito foi observado às 48 h e 120 h, respectivamente. Para a associação de clioquinol (0,125 µg / mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg / mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL), o efeito fungicida foi observado às 96 h (Figura 7). Como esperado, as concentrações sub-inibitórias dos agentes antifúngicos, quando testadas isoladamente, não apresentaram atividade fungicida em nenhum momento (Figura 7).

Ao analisar os resultados da viabilidade celular (Figura 8), é possível notar que quando combinado clioquinol + terbinafina não foi observado diferença significativa comparado ao controle negativo, demonstrando que esta combinação não apresentou toxicidade pela metodologia utilizada. Ao contrário, a combinação de clioquinol + ciclopirox olamina e a combinação tripla apresentaram diferença estatística do controle negativo, o que mostra algum grau de toxicidade. Todas as soluções testadas apresentam menor toxicidade quando comparadas ao controle positivo ($p < 0,05$).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) do clioquinol (CQ), ciclopirox olamina (CP) e terbinafina (TB) quando testados sozinhos e em combinação frente a dermatófitos.

ISOLADOS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			CIM da combinação ($\mu\text{g/mL}$) Clioquinol + Ciclopirox olamina				CIM da combinação ($\mu\text{g/mL}$) Clioquinol + Terbinafina				CIM da combinação ($\mu\text{g/mL}$) Clioquinol + Ciclopirox olamina + Terbinafina				
	CQ	CP	TB	CQ	CP	ICIF	INTER	CQ	TB	ICIF	INTER	CQ	CP	TB	ICIF	INTER
TRU45	0,500	2,0	0,0625	0,250	0,250	0,625	IND	0,125	0,155	0,500	SIN	0,125	0,500	0,0156	0,750	SIN
TRU47*	1,0	2,0	0,500	0,125	0,500	0,375	SIN	0,125	0,0625	0,250	SIN	0,125	0,250	0,03125	0,312	SIN
TRU51	1,0	2,0	0,500	0,500	0,250	0,625	IND	0,125	0,125	0,375	SIN	0,0625	0,250	0,0625	0,312	SIN
TME60	1,0	1,0	0,062	1,0	1,0	1,250	IND	1,0	0,0077	1,125	IND	0,0625	0,250	0,0312	0,625	SIN
TME16	0,5	1,0	0,500	0,500	0,250	1,250	IND	0,0625	0,250	0,375	SIN	0,0625	0,125	0,0625	0,375	SIN
TME32	1,0	2,0	0,0625	0,250	0,125	0,375	SIN	0,500	0,001	0,516	IND	0,250	0,250	0,0156	0,625	SIN
MCA01	1,0	2,0	0,500	0,125	0,250	0,375	SIN	0,0625	0,248	0,625	IND	0,125	0,500	0,125	0,625	SIN
MCA29	1,0	4,0	0,008	0,250	0,125	0,281	SIN	0,250	0,001	0,375	SIN	0,250	2,0	0,002	1,0	IND
MCA33	1,0	4,0	0,0625	0,250	2,0	0,750	IND	0,0625	0,03125	0,625	IND	0,0625	1,0	0,0152	0,562	SIN
NGY42	1,0	2,0	0,0625	0,250	0,500	0,500	SIN	0,0625	0,03125	0,5625	IND	0,0625	1,0	0,0156	0,812	IND
NGY50	0,500	2,0	0,250	0,125	0,250	0,500	SIN	0,125	0,125	0,750	IND	0,125	0,500	0,125	1,0	IND
NGY58	1,0	2,0	0,125	0,0625	1,0	0,5625	IND	0,0625	0,125	1,0625	IND	0,125	0,250	0,0312	0,500	SIN

* Isolado submetido ao ensaio de tempo de morte

ICIF: índice da concentração inibitória fracionada; INTER: interação; IND: indiferente; SIN: sinérgico.

TRU: *Trichophyton rubrum*; TME: *Trichophyton mentagrophytes*; MCA: *Microsporium canis*; NGY: *Nannizzia gypsea*.

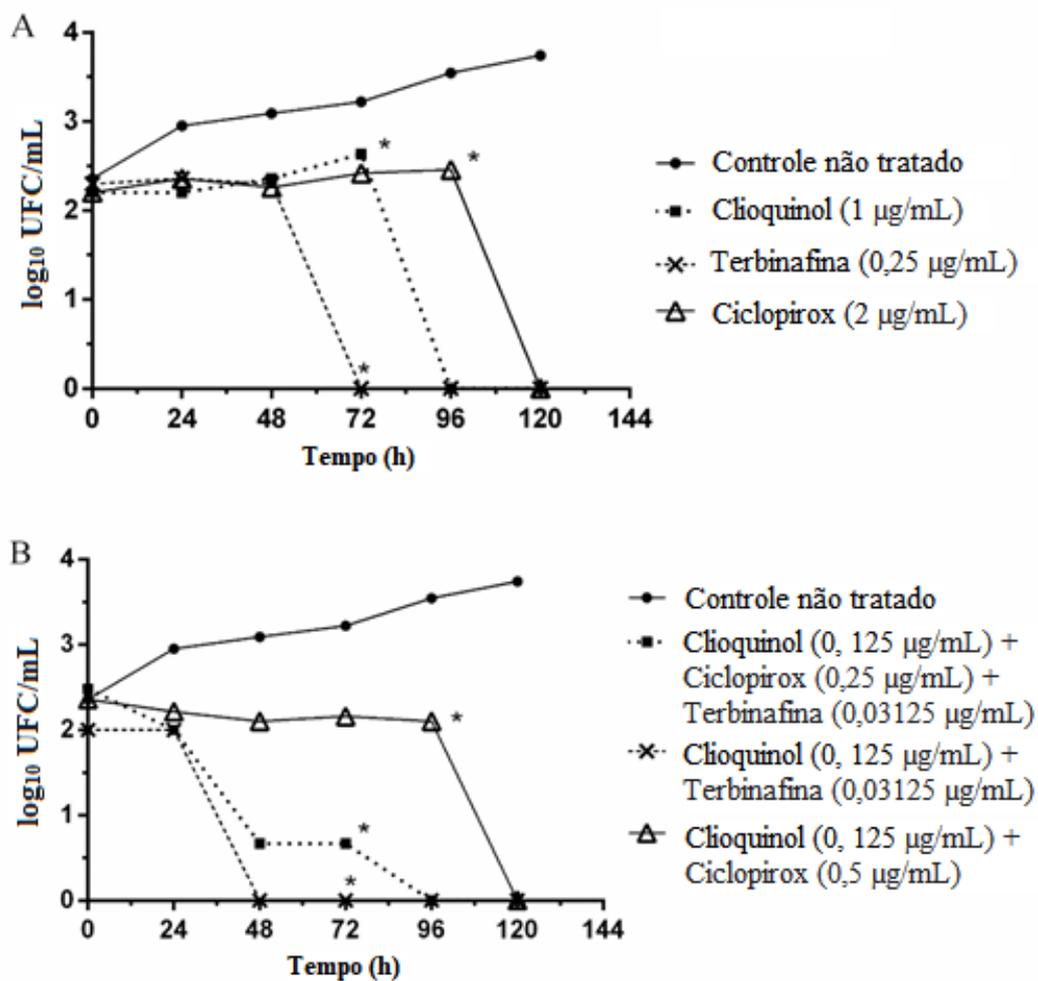


Figura 6. Curva do ensaio de tempo de morte para o clioquinol, terbinafina e ciclopirox olamina nas suas concentrações inibitórias mínimas (A) e os agentes antifúngicos nas combinações duplas e tripla (B) para o isolado TRU47. O asterisco indica diferença estatística quando comparado ao controle sem tratamento (* $p < 0,05$).

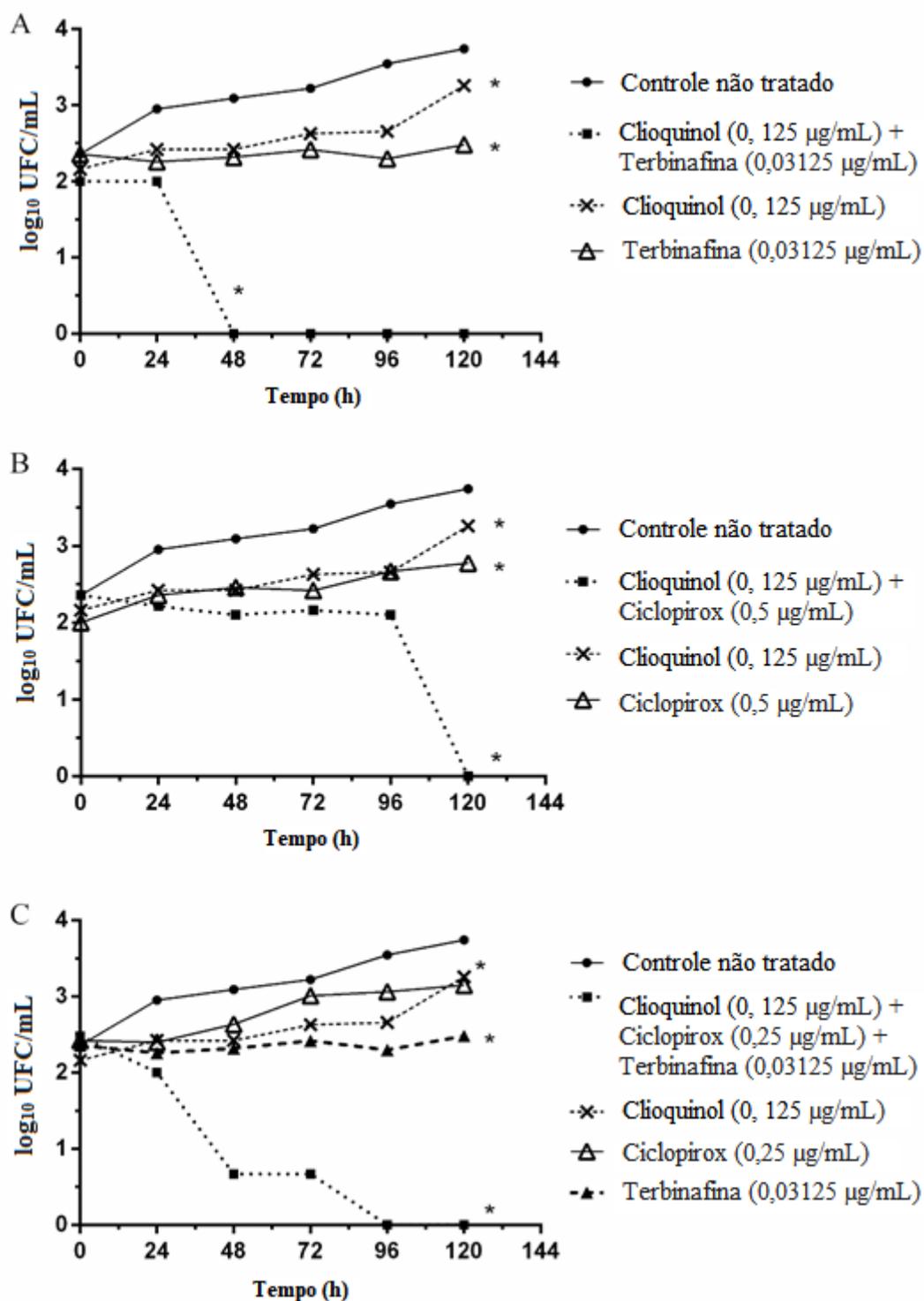


Figura 7. Curva do ensaio de tempo de morte para as combinações entre clioquinol + terbinafina (A), clioquinol + ciclopirox olamina (B) e clioquinol + ciclopirox olamina + terbinafina (C) comparando com os agentes antifúngicos sozinhos na mesma concentração para o isolado do TRU47. O asterisco indica diferença estatística quando comparado com o controle sem tratamento (* $p < 0,05$).

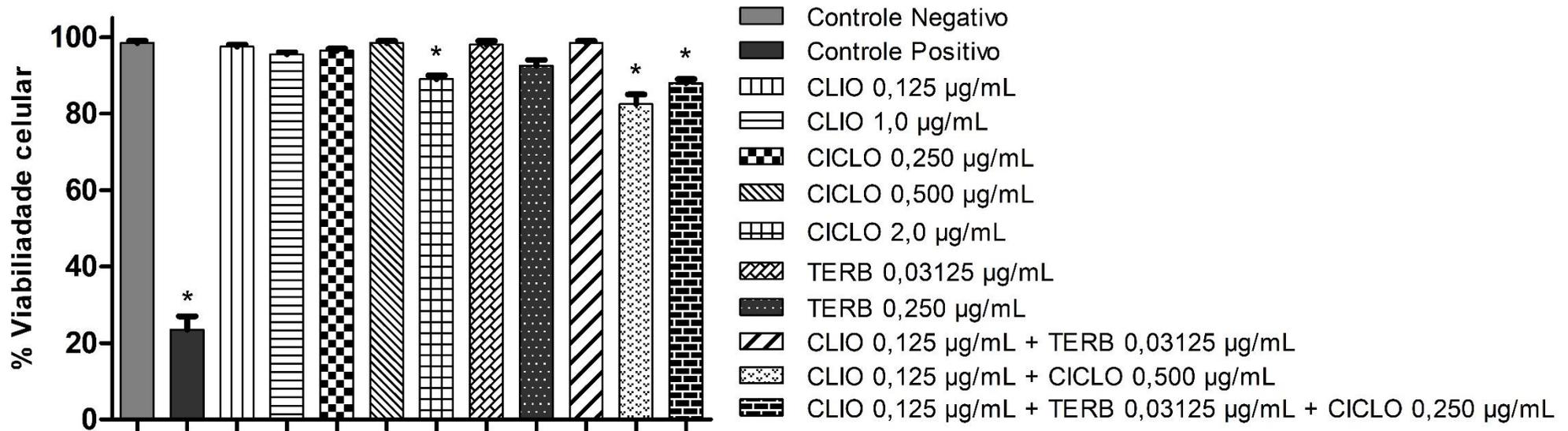


Figura 8. Porcentagem de leucócitos humanos viáveis após exposição aos agentes antifúngicos clioquinol (CLIO), terbinafina (TERB) e ciclopirox olamina (CICLO) em suas concentrações inibitórias mínimas (clioquinol: 1,0 µg/mL; ciclopirox olamina: 2,0 µg/mL; terbinafina: 0,250 µg/mL) e, nas concentrações das combinações duplas (clioquinol: 0,125 µg/mL; ciclopirox olamina: 0,5 µg/mL; terbinafina: 0,03125 µg/mL) e tripla (clioquinol: 0,125 µg/mL; ciclopirox olamina: 0,250 µg/mL; terbinafina: 0,02125 µg/mL), bem como aos agentes antifúngicos combinados. Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação com o controle negativo (* p < 0,05).

O resultado do HET-CAM mostrou que o índice de irritabilidade para a combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) foi 3,17; para a combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL) foi 2,83; e para a combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) foi 3,41. Todas as combinações mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle positivo (índice de irritabilidade = 19,81). Uma vez que todas as combinações apresentaram índice de irritabilidade menor que 5, elas foram classificadas como não irritantes de acordo com a metodologia utilizada. As reações fisiológicas na membrana corioalantoide quando submetidas às combinações e aos controles podem ser visualizadas na Figura 9. Além disso, os resultados da avaliação histopatológica da pele da orelha de suínos incubada com as combinações duplas de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) e de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL) e com a combinação tripla de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) não mostrou lesões microscópicas como apresentado na Figura 10.

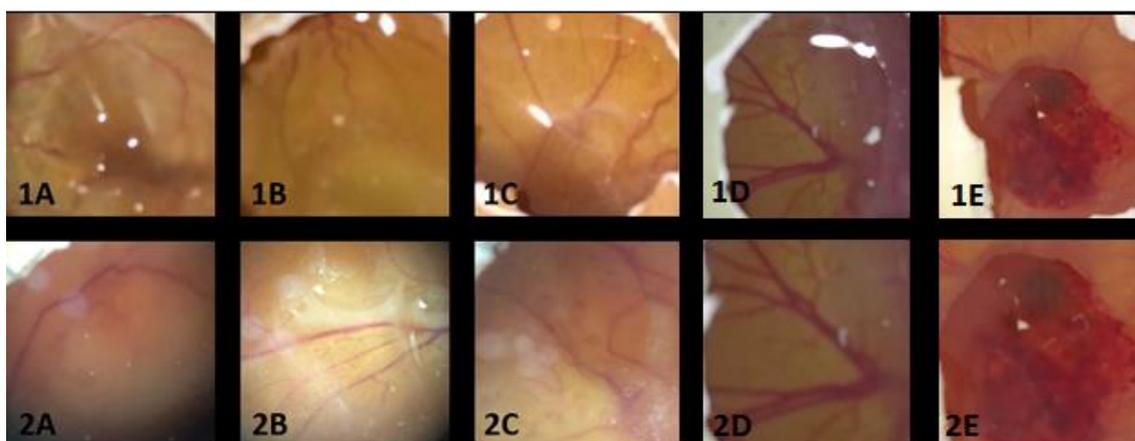


Figura 9. Observação das reações fisiológicas na membrana corioalantoide quando submetidas às combinações de agentes antifúngicos e aos controles, de acordo com a metodologia Het- CAM.

1A. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL);

2A. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) com ampliação de 20x;

1B. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL);

2B. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL) com ampliação de 20x;

1C. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL);

2C. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,250 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) com ampliação de 20x;

- 1D.** Controle negativo (solução salina 0,9%);
2D. Controle negativo (solução salina 0,9%) com ampliação de 20x;
1E. Controle positivo (NaOH 0,1M);
2E. Controle positivo (NaOH 0,1M) com ampliação de 20x.

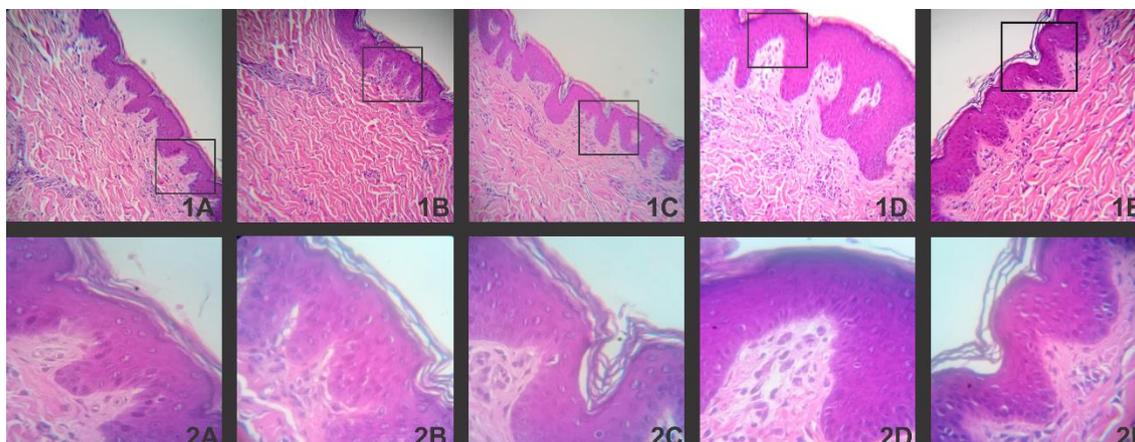


Figura 10. Avaliação histopatológica de células epidérmicas de orelha de suínos tratadas com as combinações dos agentes antifúngicos e os controles com ampliação de 100 e 400 vezes.

- 1A.** Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) com aumento de 100 vezes;
2A. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) com aumento de 400 vezes;
1B. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL) com aumento de 100 vezes;
2B. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox olamina (0,5 µg/mL) com aumento de 400 vezes;
1C. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox (0,250 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) com aumento de 100 vezes;
2C. Combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox (0,250 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) com aumento de 400 vezes;
1D. Controle negativo (PBS pH 7,0) com aumento de 100 vezes;
2D. Controle negativo (PBS pH 7,0) com aumento de 400 vezes;
1E. Controle positivo (NaOH 0,1M) com aumento de 100 vezes;
2E. Controle positivo (NaOH 0,1M) com aumento de 400 vezes.

Quando analisados os resultados da atividade das combinações dos agentes antifúngicos em cascos suínos, nota-se que tanto as combinações duplas quanto a combinação tripla apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle não tratado. (Figura 11). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos analisados, apenas as combinações duplas conseguiram remover 100% das UFCs formadas nos cascos suínos.

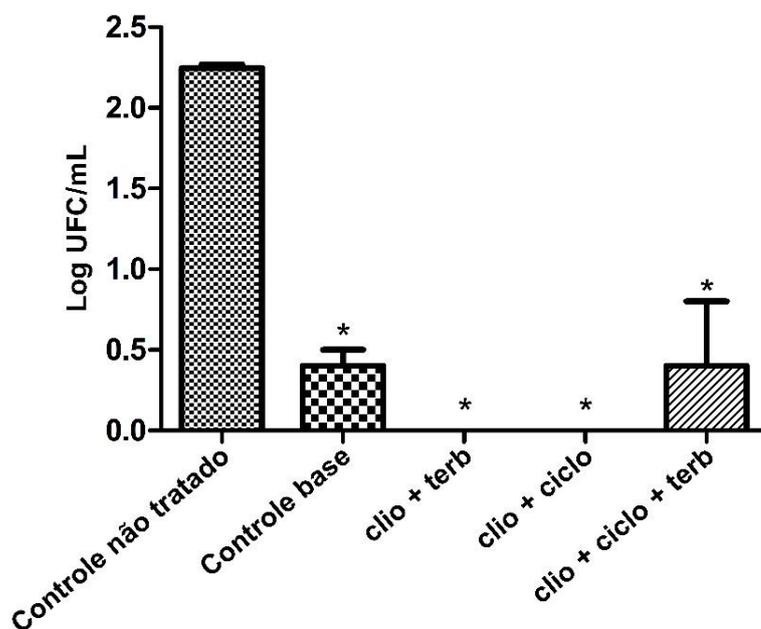


Figura 11. Contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) após cascos suínos serem tratados com a base de esmalte para unhas, bem como com a base com adição das combinações dos agentes antifúngicos [clioquinol (CLIO), terbinafina (TERB) e ciclopirox (CICLO)] nas combinações de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL), de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox (0,5 µg/mL) e da combinação tripla de clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox (0,250 µg / mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL). Os asteriscos indicam diferença estatística em comparação ao controle não tratado (* p <0,05).

Em relação ao efeito das combinações frente aos pelos de origem animal, a inibição da formação do biofilme foi mais efetiva quando utilizado a combinação clioquinol (0,125 µg/mL) + ciclopirox (0,5 µg/mL) (Figura 12). Por outro lado, a combinação de clioquinol (0,125 µg/mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) e a combinação tripla de clioquinol (0,125 µg / mL) + ciclopirox (0,250 µg / mL) + terbinafina (0,03125 µg/mL) foram mais efetivas na erradicação do biofilme pré-formado, removendo quase que 100% das células

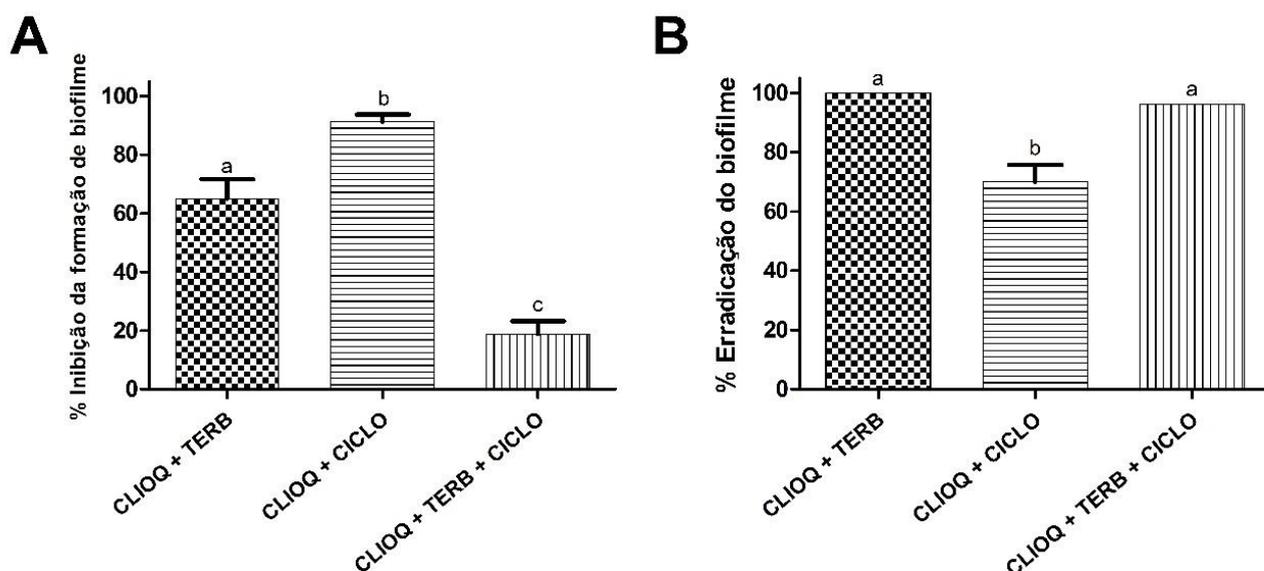


Figura 12. Avaliação da eficácia da proteção e remoção do biofilme fúngico das combinações dos antifúngicos: clioquinol (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafina (0,03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), clioquinol (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e clioquinol (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafina (0,03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em pelos de origem animal. **(A)** Porcentagem de inibição da formação do biofilme utilizando as combinações dos agentes antifúngicos. **(B)** Porcentagem de erradicação do biofilme formado utilizando as combinações dos agentes antifúngicos. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Clioquinol (CLIQ), terbinafina (TERB) e ciclopirox (CICLO)

6. DISCUSSÃO

A limitada eficácia da monoterapia de agentes antifúngicos disponíveis no mercado e a dificuldade de introduzir novos fármacos tornam a terapia combinada uma estratégia terapêutica importante. Vários autores demonstraram interações benéficas entre diferentes agentes antifúngicos para diversas infecções fúngicas (Chang et al. 2017; Fuentefria et al. 2018; Hill e Cowen 2015; Martin-Pena et al. 2014), tais como voriconazol + caspofungina no tratamento de aspergilose (Raad et al. 2015), posaconazol + caspofungina no tratamento de candidíase (Chen et al. 2013), e amorolfina + itraconazol (Tamura et al. 2014) bem como ciclopirox + terbinafina (Gupta e Kohli 2003) em casos de dermatofitoses.

As associações duplas e tripla com clioquinol mostraram efeito sinérgico no presente estudo, e essa complexa interação pode ser explicada pelo fato de cada um dos três fármacos ter efeito sobre diferentes alvos. O mecanismo antifúngico de ação do clioquinol não é bem conhecido, mas recentemente Pippi et al. (2018) observaram que este fármaco apresenta ação na parede celular de dermatófitos. Por outro lado, o ciclopirox atua intracelularmente. A alta afinidade do ciclopirox por cátions trivalentes, como o Fe^{3+} , inibe enzimas dependentes de metais e afeta a produção de energia nas cadeias de transporte de elétrons nas mitocôndrias, absorção de nutrientes e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Gupta et al. 2013). Já a terbinafina inibe o esqualeno epoxidase, uma enzima envolvida na biossíntese de ergosterol (Baddley e Pappas 2005; Danielli et al. 2017; Salehi, Shams-Ghahfarokhi, e Razzaghi-Abyaneh 2018).

Assim, uma ação na parede celular dos dermatófitos causada pelo clioquinol pode facilitar a penetração da terbinafina e do ciclopirox olamina na célula, aumentando a quantidade de fármaco intracelular disponível para exercer seu efeito. Esse evento pode resultar na morte rápida da célula em doses mais baixas de antifúngicos e justifica as interações sinérgicas das combinações aqui avaliadas. Além disso, a maior frequência de sinergismo triplo em comparação com os dois sinergismos duplos pode estar relacionada ao aumento do influxo de ciclopirox olamina como resultado da alteração da permeabilidade na membrana celular fúngica causada pela terbinafina, a qual diminui a quantidade de ergosterol.

Existem poucos dados disponíveis sobre combinações antifúngicas triplas. Dannaoui et al. (2004) e O'Shaughnessy et al. (2006) relataram combinação sinérgica *in vitro* de caspofungina + flucitosina + anfotericina B e caspofungina + flucitosina + voriconazol para *Aspergillus* spp., respectivamente (Dannaoui, Lortholary e Dromer

2004; O'Shaughnessy et al. 2006). Odds (1982) também descreveu sinergismo para combinação tripla. Eles observaram que a anfotericina B + flucitosina + miconazol ou cetoconazol era sinérgico para *Candida* spp. e *A. fumigatus*.

Em humanos, existem poucos relatos de casos com resultados bem-sucedidos com terapia antifúngica tripla. Tascini et al. (2003) descreveram um tratamento bem-sucedido com anfotericina B + itraconazol + caspofungina e Sims-McCallum (2003) relatou um tratamento com anfotericina B + caspofungina + voriconazol, ambos em pacientes com aspergilose. Para fungos dermatofíticos, estudos de interação tripla ainda não foram descritos na literatura até o momento.

O estudo do sinergismo aqui avaliado demonstrou que a combinação tripla aumentou o espectro de ação em comparação com as combinações duplas, pois um número maior de isolados foi suscetível a menores concentrações quando todos os três antifúngicos estavam associados. No entanto, o método *checkerboard* não leva em consideração as mudanças dinâmicas no crescimento e a suscetibilidade do fungo ao longo do tempo (Kaur e Kakkar 2010). Portanto, as curvas de tempo de morte foram usadas para obter informações detalhadas sobre a eficácia antifúngica em função do tempo e da concentração/associação. Clioquinol, ciclopirox olamina e terbinafina demonstraram efeito fungicida dependente da concentração e do tempo de exposição (Figura 6A), bem como relatado anteriormente por Pippi et al. (2017), Kaur e Kakkar (2010) e Subissi et al. (2010), respectivamente.

A combinação tripla de clioquinol + ciclopirox olamina + terbinafina mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos agentes antifúngicos isolados nas mesmas concentrações, mostrando que a interação tem um caráter sinérgico para o isolado TRU47, como também indicado no *checkerboard* (Figura 7C). As combinações duplas (clioquinol + terbinafina; e clioquinol + ciclopirox olamina) apresentaram o mesmo comportamento (Figura 7A e 7B) corroborando também com o *checkerboard*. Todos os tratamentos mostraram diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle não tratado, exceto ciclopirox olamina na concentração 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6 e 7).

A análise estatística demonstrou que a combinação clioquinol + terbinafina e a combinação tripla não apresentou diferença estatística entre elas para o isolado TRU 47. Portanto, a adição de ciclopirox olamina não pareceu influenciar no efeito antifúngico das associações para este isolado. Ainda assim, essas combinações foram mais eficazes que a combinação de clioquinol + ciclopirox olamina ($p < 0,05$).

A combinação de clioquinol + terbinafina foi estatisticamente melhor do que todos os antifúngicos testados em suas CIMs e essa combinação mostrou um efeito fungicida mais rápido que todos os outros tratamentos (48 h). A combinação tripla também foi estatisticamente melhor que a CIM de clioquinol e do ciclopirox olamina, e não mostrou diferença para a CIM da terbinafina. No entanto, a combinação tripla tem a vantagem de apresentar uma dose mais baixa de terbinafina (oito vezes menor que a CIM) e aumentar o espectro de ação. Por outro lado, a combinação clioquinol + ciclopirox olamina apresenta menor efeito que a CIM de terbinafina e do clioquinol, e não mostrou diferença significativa para CIM do ciclopirox olamina. Apesar do efeito mais baixo do que os antifúngicos isolados, é importante destacar que as concentrações usadas na combinação clioquinol + ciclopirox olamina são oito vezes menores que a CIM do clioquinol e quatro vezes menores que a CIM do ciclopirox olamina.

A utilização de tecidos *ex vivos* em um ambiente artificial pode estabelecer condições favoráveis para o desenvolvimento de uma condição infecciosa, preservando parcialmente a estrutura dos tecidos e os diferentes tipos celulares presentes. Desta forma, os modelos *ex vivo* tem se tornado uma alternativa atraente nos ensaios de desenvolvimento de novas formulações antifúngicas, tendo a vantagem de não precisar da aprovação de um comitê de ética (Lossi e Merighi 2018; Rosso 2014).

Quando analisado os resultados do modelo de onicomicose, podemos observar que as combinações duplas (clioquinol + terbinafina e clioquinol + ciclopirox olamina) demonstraram ser uma opção terapêutica interessante, uma vez que conseguiram inibir 100% do crescimento fúngico. Além disso, não demonstraram nenhum crescimento ao analisar a recidiva. Estudos anteriores mostram que a erradicação completa da onicomicose com a utilização de esmalte de ciclopirox olamina 8% se dá em poucos casos (em torno de 8,5% dos casos) e com mais de 48 semanas de tratamento (Lipner 2019). Santos e Hamdan (2006) demonstraram que a utilização da associação de ciclopirox olamina + cetoconazol e ciclopirox olamina + itraconazol é mais eficiente que a monoterapia. Além disso, estudos prévios também mostraram que a utilização da amorolfina em combinação com terbinafina tem resultados satisfatórios para o tratamento de onicomicose, sendo uma estratégia para combater tal infecção (Baran et al. 2007; Evans 2003). A vantagem da utilização da terapia combinada utilizando forma oral e tópica concomitantemente no tratamento da

onicomicose, como no caso de clioquinol + terbinafina, é que os agentes antifúngicos conseguem penetrar na unha por duas regiões distintas: os orais atingem o patógeno fúngico através do leito ungueal (parte debaixo das unhas), enquanto que os tópicos são absorvidos através da queratina na superfície da unha e, dessa forma, leva a efeitos complementares no tratamento (Evans 2003).

Quando submetidos ao tratamento de dermatofitoses os cães são tratados com xampu contendo cetoconazol ou miconazol e pesquisas já demonstraram que a utilização desses agentes antifúngicos sozinhos não é tão eficiente, tendo que ser associados com outro componente, como, por exemplo, a clorexidina, para melhorar a atividade (Perrins e Bond 2003). Existem formulações disponíveis no mercado em associação com clorexidina, porém, este é um antimicrobiano de amplo espectro não muito indicado para o tratamento de dermatofitoses, uma vez que sua principal indicação é antibacteriana (Mueller et al. 2012). Entretanto, alguns estudos comprovaram o efeito sinérgico da associação de clorexidina com miconazol e cetoconazol para dermatófitos (Moriello 2017; Moriello e Verbrugge 2007). Além disso, apesar da forma tópica da terbinafina ser raramente estudada (Moriello et al. 2017; Nam et al. 2013), existem relatos que demonstraram a eficácia do xampu veterinário contendo cloridrato de terbinafina associado à gluconato de clorexidina em cães com dermatofitose (Nam et al. 2013), mostrando que associações de antimicrobianos podem ser uma opção terapêutica importante para tratar esses animais.

Nosso estudo também demonstra resultados satisfatórios quando antimicrobianos são associados a fim de tratar ou prevenir dermatofitoses que acometem pelos de animais domésticos. Até o momento, nenhum estudo similar utilizando ciclopirox olamina, clioquinol e terbinafina foi relatado na literatura. No presente estudo a associação de clioquinol + ciclopirox olamina demonstrou ser efetiva na inibição da formação de biofilme em pelos de origem animal, podendo, no futuro, ser uma alternativa terapêutica de sucesso na prevenção de infecções por dermatófitos. Entretanto, quando abordado a remoção do biofilme formado nos pelos, as associações clioquinol + terbinafina e clioquinol + ciclopirox olamina + terbinafina mostraram ser mais eficazes, o que sugere uma utilização futura como alternativa aos tratamentos convencionais de dermatofitoses com xampu contendo miconazol ou cetoconazol (Perrins e Bond 2003). Assim, esta pesquisa mostra um campo a ser explorado, pois os resultados encontrados são motivadores e o efeito do clioquinol em combinação com fármacos antifúngicos é um achado sem precedentes.

Os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular demonstraram melhores resultados para a combinação de clioquinol + terbinafina, uma vez que esta combinação foi a única que não apresentou citotoxicidade em leucócitos humanos. Pinto, Sandoval, e Vargas (2019) demonstraram que a terbinafina em uma concentração de 0,3 µg/mL exibe citotoxicidade na cultura de células VERO. Assim, os resultados obtidos aqui são altamente relevantes uma vez que baixas concentrações de agentes antifúngicos foram combinadas e obteve-se melhor ação e menor toxicidade.

Além disso, os resultados de baixa toxicidade obtidos para as combinações na avaliação histopatológica são extremamente satisfatórios e corroboram com a baixa irritabilidade encontrada na membrana corioalantoide. Essas propriedades são algumas das características importantes na avaliação e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento de dermatofitoses, visto que a terapia tópica é a mais utilizada nesses casos, e a formulação pode permanecer por um período prolongado em contato com a pele (Gupta, Agrawal, e Vyas 2012).

Quando usado topicamente, o clioquinol pode produzir irritação da pele, prurido, eritema, inchaço ou dor em concentrações usuais (Beck e Wilkinson 1994; Kero, Hannuksekla, e Sothman 1979; Morris et al. 2002; Mussani, Poon, and Skotnicki-grant 2013). Foti et al (2001) relataram um caso de dermatite de contato quando utilizado o ciclopirox olamina em doses usuais, fármaco este amplamente utilizado como tópico. Da mesma forma, foi relatado por Bhari et al. (2017) um caso de dermatite alérgica ao utilizar terbinafina. Entretanto, esses achados são considerados raros. Ao associar clioquinol aos outros agentes antifúngicos, as concentrações utilizadas são menores e, desta forma a toxicidade dos compostos pode ser diminuída. Porém, testes *in vivo* ainda são necessários para analisar a ação antifúngica dos fármacos associados, bem como as respostas toxicológicas.

Esses achados são extremamente relevantes visto que as formulações disponíveis no mercado para o tratamento de dermatofitoses tem baixa eficácia. Além disso, os resultados deste trabalho são interessantes para a área veterinária, visto que não existe formulação de uso tópico contendo clioquinol, apenas em apresentação de uso humano que pode ser utilizada em animais. Desta forma, a utilização de clioquinol em formulações neste campo se torna uma alternativa terapêutica que pode ser explorada.

Os relatórios clínicos sugerem que a combinação entre antifúngicos orais e

tópicos (por exemplo, ciclopirox olamina tópica e terbinafina oral ou morolfina tópica e terbinafina oral), administrados por um período mais curto em comparação com o regime padrão, podem resultar em taxas de cura tão boas quanto ou melhores que o regime de monoterapia oral indicado (Gupta e Lynch 2004; Evans 2003). A penetração de drogas em diferentes partes da unha, pele ou pelo, e mecanismos de ação complementares podem contribuir para o sucesso da terapia combinada (Evans 2003). Além disso, a combinação ciclopirox olamina e terbinafina também demonstrou sinergia contra espécies não dermatofíticas como por exemplo *Fusarium solani*, *Scytalidium dimidiatum*, *Scopulariopsis brevicaulis* (Gupta e Kohli 2003)

Por fim, os experimentos e resultados encontrados no presente estudo são representados de forma esquemática na Figura 13. Eles tem grande importância no atual cenário devido à falta de resposta à terapia antifúngica e às altas taxas de recidiva, apontando para a necessidade de uma mudança na abordagem do tratamento de dermatofitoses (Scher e Baran 2003).

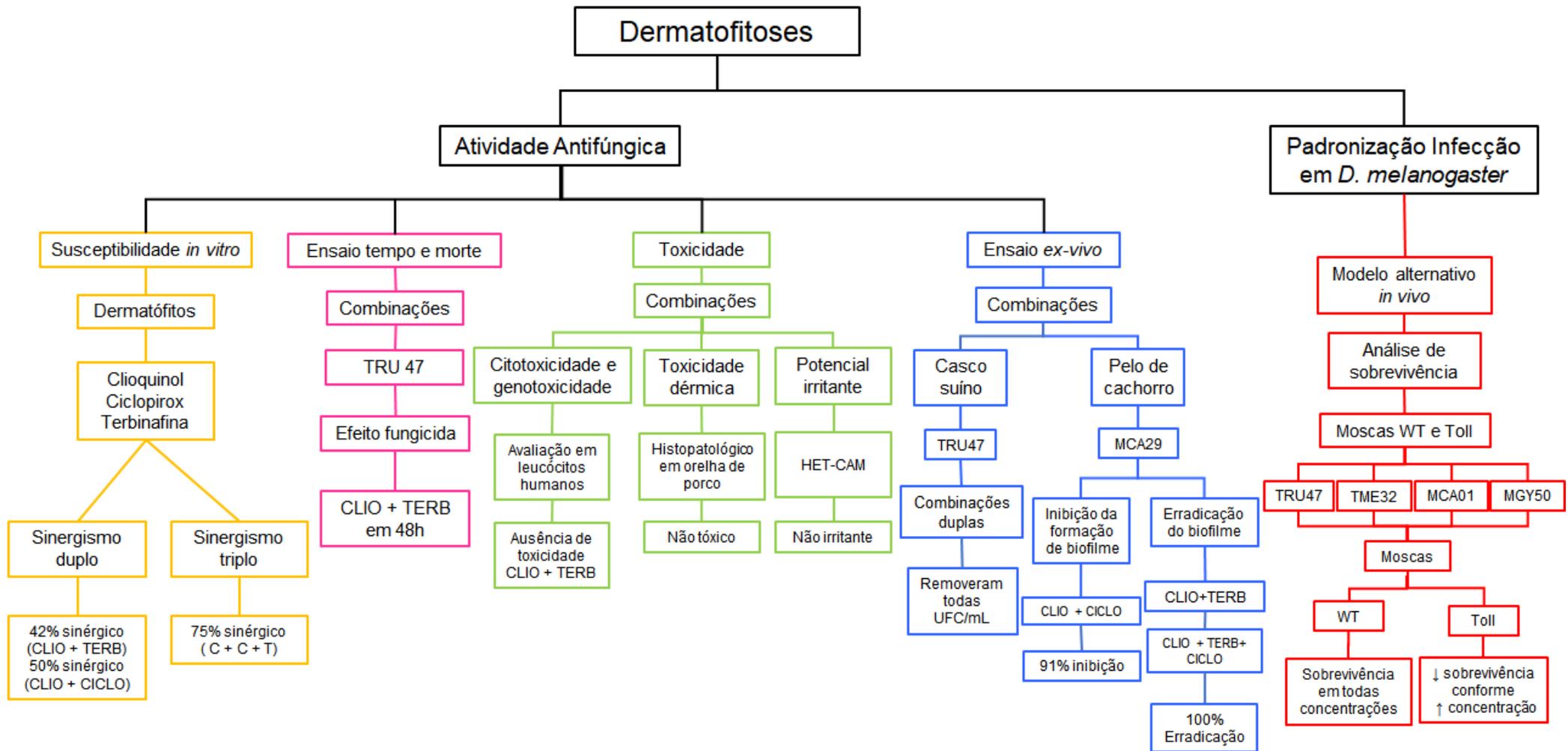


Figura 13. Representação esquemática dos principais resultados obtidos no trabalho

7. CONCLUSÃO

- Todas as combinações duplas e triplas testadas exibiram um efeito fungicida dependente do tempo para o isolado TRU47 testado;

- A combinação de clioquinol + terbinafina foi tão ativa quanto a combinação tripla. Desta forma, não há a necessidade do ciclopirox olamina para obter o mesmo efeito;

- Quando associado o clioquinol + ciclopirox olamina, o efeito fungicida se dá em 120h, um período de tempo prolongado, em relação às outras combinações testadas;

- A combinação tripla também demonstrou o efeito fungicida para o isolado testado (em 96h), tendo o mesmo efeito do que a combinação dupla de clioquinol + terbinafina. Porém, tem a vantagem de aumentar o espectro de ação em comparação com as combinações testadas;

- As combinações clioquinol + ciclopirox olamina e clioquinol + ciclopirox olamina + terbinafina apresentaram caráter citotóxico em leucócitos humanos. Entretanto, a combinação clioquinol + terbinafina não apresentou citotoxicidade e, portanto, demonstra-se como uma opção interessante no tratamento de dermatofitoses;

- Ao realizar os ensaios de avaliação histopatológica e de irritabilidade todas as combinações testadas não apresentaram reação de toxicidade;

- A utilização das associações duplas de clioquinol + terbinafina e clioquinol + ciclopirox olamina no tratamento da onicomicose obtiveram melhores resultados quando comparadas com a associação tripla e, portanto, podem se tornar opções terapêuticas no tratamento dessas infecções fúngicas.

- Para a prevenção da formação de biofilme em pelos de origem animal, a associação clioquinol + ciclopirox olamina conseguiu atingir melhores resultados quando comparada com as demais. Entretanto, na erradicação do biofilme pré-estabelecido, a associação clioquinol + terbinafina e a combinação tripla apresentou os melhores resultados;

- A associação de clioquinol + terbinafina demonstrou ser a melhor opção para o tratamento de dermatofitose, uma vez que não apresentou toxicidade nos ensaios, teve o efeito fungicida mais rapidamente (48h) e demonstrou ser efetiva quando

utilizada nos modelos *ex vivo*, mostrando, assim, ser promissora em terapia antifúngica tópica e sistêmica;

- A inclusão de clioquinol em combinação com antifúngicos no tratamento da dermatofitose pode ser uma importante estratégia terapêutica para superar problemas relacionados à resistência, espectro de ação e toxicidade dos antifúngicos atuais utilizados na clínica médica;

8. PERSPECTIVAS

Com o propósito de desenvolver uma formulação comercial, estudos em mamíferos são necessários e devem ser conduzidos em breve para realizar a caracterização farmacocinética das combinações a fim de obter a dosagem correta, além de avaliar a ação antifúngica e toxicológica nesses animais também.

No futuro próximo, também pretendemos realizar estudos da atividade antifúngica de fármacos, novos compostos em desenvolvimento e associação de antimicrobianos sobre infecção dermatofítica sistêmica estabelecida em *D. melanogaster*. As associações duplas e triplas abordadas nesse trabalho serão testadas nas moscas em breve.

9. REFERÊNCIAS

- Al-janabi, Ali Abdul Hussein S, Nabaa N Ai-tememi, Rabab A Ai-shammari, and Abdul Hadi A Ai-assadi. 2016. "Suitability of Hair Type for Dermatophytes Perforation and Differential Diagnosis of T. Mentagrophytes from T. Verrucosum." *Mycoses* 59: 247–52.
- Alshehri, Jawaher M et al. 2016. "Evaluation of Corneal Cross-Linking for Treatment of Fungal Keratitis : Using Confocal Laser Scanning Microscopy on an *Ex vivo* Human Corneal Model." *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.
- Andrade, Verônica, and Gabriel Augusto Marques Rossi. 2019. "Dermatofitose Em Animais de Companhia e Sua Importância Para a Saúde Pública – Revisão de Literatura." *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Anima* 13(1): 142–55.
- Aneke, Chioma I, Domenico Otranto, and Claudia Cafarchia. 2018. "Therapy and Antifungal Susceptibility Profile of *Microsporum Canis*." *Journal of fungi* 4: 107.
- Apidianakis, Yiorgos et al. 2004. "Challenge of *Drosophila Melanogaster* with *Cryptococcus Neoformans* and Role of the Innate Immune Response." *Eukaryotic Cell* 3(2): 413–19.
- Baddley, J, and P Pappas. 2005. "Antifungal Combination Therapy." *Current Opinion in Investigational Drugs* 2(10): 1364–65.
- Baran, R. et al. 2007. "A Multicentre, Randomized, Controlled Study of the Efficacy, Safety and Cost-Effectiveness of a Combination Therapy with Amorolfine Nail Lacquer and Oral Terbinafine Compared with Oral Terbinafine Alone for the Treatment of Onychomycosis with Matrix Invol." *British Journal of Dermatology* 157(1): 149–57.
- Beauvais, Anne, and Jean-paul Latgé. 2015. "Aspergillus Biofilm In Vitro and In Vivo." *Microbiology spectrum*.
- Beck, M. H., and S. M. Wilkinson. 1994. "A Distinctive Irritant Contact Reaction to Vioform (Clioquinol)." *Contact Dermatitis* 31: 55.
- Betsabee, Ocampo-Suarez Iris, Sanchez-Salas José Luis, and Calderón-Santoyo Montserrat Ragazzo-Sánchez Juan Arturo. 2016. "Toxicology Research." *Toxicology research* 00(1).
- Bhari, Neetu, Kanika Sahni, Tanvi Dev, and Vinod K. Sharma. 2017. "Symmetrical Drug-Related Intertriginous and Flexural Erythema (Baboon Syndrome) Induced by Simultaneous Exposure to Oral and Topical Terbinafine." *International Journal*

- of Dermatology* 56(8): e168–70.
- Bond, Ross. 2010. “Superficial Veterinary Mycoses.” *Clinics in Dermatology* 28(2): 226–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.012>.
- Burow, Matthew E. et al. 1998. “Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -Induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants.” *Cancer Research* 58(21): 4940–46.
- Campoy, Sonia, and José L. Adrio. 2017. “Antifungals.” *Biochemical Pharmacology* 133: 86–96.
- Chamilos, Georgios et al. 2006. “Drosophila Melanogaster as a Facile Model for Large-Scale Studies of Virulence Mechanisms and Antifungal Drug Efficacy in Candida Species.” *The Journal of Infectious Diseases* 193(7): 1014–22.
- Chang, Ya Lin et al. 2017. “New Facets of Antifungal Therapy.” *Virulence* 8(2): 222–36.
- Chen, Ying Lien et al. 2013. “Posaconazole Exhibits In Vitro and In Vivo Synergistic Antifungal Activity with Caspofungin or FK506 against Candida Albicans.” *PLoS ONE* 8(3).
- Clark, Judy Macarthur et al. 2017. “The 3Rs in Research : A Contemporary Approach to Replacement , Reduction and Re Fi Nement.” *British Journal of Nutrition* 120(s1): 1–7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 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.
- Costa-Orlandi, C B, J C O Sardi, and C T Santos. 2014. “In Vitro Characterization of Trichophyton Rubrum and T . Mentagrophytes Biofilms.” *Biofouling : The Journal of Bioadhesion and Biofilm* 30(6): 719–27.
- Cowen, Leah E et al. 2015. “Mechanisms of Antifungal Drug Resistance.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(7): 1–22.
- da Cunha, Michele Milano et al. 2019. “Epidemiological Investigation and Molecular Typing of Dermatophytosis Caused by Microsporum Canis in Dogs and Cats.”

- Preventive Veterinary Medicine* 167(March): 39–45.
- Dalla Lana, Aline Jacobi et al. 2018. “In Vitro Additive Effect on Griseofulvin and Terbinafine Combinations against Multidrug-Resistant Dermatophytes.” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 54(2).
- Dalla Lana, Daiane Flores, Bruna Gerardon Batista, Sydney Hartz Alves, and Alexandre Meneghello Fuentefria. 2016. “Artigo de Revisão.” *Clin Biomed Res* 36(4): 230–41.
- Danielli, L J et al. 2017. “Biofilm Formation by *Microsporum Canis*.” *Clinical Microbiology and Infection* 23(12): 941–42.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.006>.
- Dannaoui, Eric, Olivier Lortholary, and Françoise Dromer. 2004. “In Vitro Evaluation of Double and Triple Combinations of Antifungal Drugs against *Aspergillus Fumigatus* and *Aspergillus Terreus*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(3): 970–78.
- De Hoog, G. S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., ... Gräser, Y. (2016). Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, 182(1-2), 5–31
- Denning, David W., and Michael J. Bromley. 2015. “How to Bolster the Antifungal Pipeline.” *Science* 347(6229): 1–4.
- Evans, E. 2003. “Drug Synergies and the Potential for Combination Therapy in Onychomycosis.” *British Journal of Dermatology* 149(65): 11–13.
- Foti, Caterina, Annalisa Diaferio, and Domenico Bonamonte. 2001. “Allergic Contact Dermatitis from Ciclopirox olamina Olamine.” *Australasian Journal of Dermatology* 42(2): 145.
- Fuentefria, A. M. et al. 2018. “Antifungals Discovery: An Insight into New Strategies to Combat Antifungal Resistance.” *Letters in Applied Microbiology* 66(1): 2–13.
- Galenza, Anthony, and Edan Foley. 2019. “Immunometabolism: Insights from the *Drosophila* Model.” 94(January): 22–34.
- Ghannoum, M. et al. 2013. “In Vitro Antifungal Activity of Naftifine Hydrochloride against Dermatophytes.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(9): 4369–72.
- Gupta, Aditya K., Kelly A. Foley, and Sarah G. Versteeg. 2017. “New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes.” *Mycopathologia* 182(1–2): 127–41.

- Gupta, Aditya K., and Y. Kohli. 2003. "In Vitro Susceptibility Testing of Ciclopirox, Terbinafine, Ketoconazole and Itraconazole against Dermatophytes and Nondermatophytes, and in Vitro Evaluation of Combination Antifungal Activity." *British Journal of Dermatology* 149(2): 296–305.
- Gupta, Aditya K, C Frcp, Maryse Paquet, and Fiona C Simpson. 2013. "Therapies for the Treatment of Onychomycosis." *Clinics in Dermatology* 31(5): 544–54.
- Gupta AK, Ryder JE, Baran R. The use of topical therapies to treat onychomycosis. *Dermatol Clin.* 2003;21(3):481-489.
- Gupta, M., U. Agrawal, and S. P. Vyas. 2012. "Nanocarrier-Based Topical Drug Delivery for the Treatment of Skin Diseases." *Expert Opinion on Drug Delivery* 9(7): 783–804.
- Hashemi, Marjan M Id et al. 2018. "Poloxamer Micelles Containing Ceragenin CSA-131 on Ciliated Tissues." *Molecules* 23(596).
- Hatipoglu, Nevin, and Husem Hatipoglu. 2013. "Combination Antifungal Therapy for Invasive Fungal Infections in Children and Adults." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 11(5): 523–35.
- Hill, Jessica A., and Leah E. Cowen. 2015. "Using Combination Therapy to Thwart Drug Resistance." *Future Microbiology* 10(11): 1719–26.
- Huang, Chen et al. 2019. "Deep Dermatophytosis Caused by *Trichophyton Rubrum*." *The Lancet Infectious Diseases* 19(12): 1380. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30551-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30551-1).
- Johnson, Melissa D et al. 2004. "Combination Antifungal Therapy MINIREVIEW Combination Antifungal Therapy." *Society* 48(3).
- Kaur, Indu Pal, and Shilpa Kakkar. 2010. "Topical Delivery of Antifungal Agents." *Expert Opinion on Drug Delivery* 7(11): 1303–27.
- Kero, M., M. Hannuksekla, and A. Sothman. 1979. "Primary Irritant Dermatitis from Topical Clioquinol." *Contact Dermatitis* 5: 115–17.
- Khurana, Ananta, Kabir Sardana, and Anuradha Chowdhary. 2019. "Antifungal Resistance in Dermatophytes: Recent Trends and Therapeutic Implications." *Fungal Genetics and Biology* 132(July): 103255. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103255>.
- Kristanc, Luka, Bojan Božič, and Špela Zemljič Jokhadar. 2018. "The Pore-Forming Action of Polyenes: From Model Membranes to Living Organisms." *Biomembranes* 11(006). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.006>.

- Labib, G., and H. Aldawsari. 2015. "Innovation of Natural Essential Oil-Loaded Orabase for Local Treatment of Oral Candidiasis." *Drug Design, Development and Therapy*: 3349–59.
- Lamaris, Gregory A., Georgios Chamilos, Russell E. Lewis, and Dimitrios P. Kontoyiannis. 2007. "Virulence Studies of *Scedosporium* and *Fusarium* Species in *Drosophila Melanogaster* ." *The Journal of Infectious Diseases* 196(12): 1860–64.
- Lanternier, Fanny et al. 2013. "Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency." *New England Journal of Medicine* 369(18): 1704–14.
- Laurent, Alexis, and Michel Monod. 2017. "Production of *Trichophyton Rubrum* Microspores in Large Quantities and Its Application to Evaluate Amorolfine/Azole Compound Interactions in Vitro." *Mycoses* 60(9): 581–86.
- Leal Pinto, Sandra Milena, Laura Viviana Herrera Sandoval, and Leonor Yamile Vargas. 2019. "In Vitro Susceptibility of *Microsporum* Spp. and Mammalian Cells to *Eugenia Caryophyllus* Essential Oil, Eugenol and Semisynthetic Derivatives." *Mycoses* 62(1): 41–50.
- Lemaitre, Bruno, and Jules Hoffmann. 2007. "The Host Defense of *Drosophila Melanogaster*."
- Lionakis, Michail S et al. 2005. "Toll- Deficient *Drosophila* Flies as a Fast , High-Throughput Model for the Study of Antifungal Drug Efficacy against Invasive Aspergillosis and *Aspergillus* Virulence." *The Journal of Infectious Diseases* 191(7): 1188–95.
- Lipner, S. R. 2019. "Pharmacotherapy for Onychomycosis New and Emerging Treatments..Pdf." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20(6): 725–35.
- Lossi, Laura, and Adalberto Merighi. 2018. "The Use of *Ex vivo* Rodent Platforms in Neuroscience Translational Research With Attention to the 3Rs Philosophy." *Frontiers in Veterinary Science* 5: 1–14.
- Makki, Rami, Einat Cinnamon, and Alex P Gould. 2014. "The Development and Functions of Oenocytes." *Annual Review of Entomology* 59(1): 405–25.
- Mao, Xinliang, and Aaron D. Schimmer. 2008. "The Toxicology of Clioquinol." *Toxicology Letters* 182(1–3): 1–6.
- Marconi, Vincent C. et al. 2010a. "Disseminated Dermatophytosis in a Patient with Hereditary Hemochromatosis and Hepatic Cirrhosis: Case Report and Review of the Literature." *Medical Mycology* 48(3): 518–27.

- Marconi, Vincent C et al. 2010b. "Case Reports Disseminated Dermatophytosis in a Patient with Hereditary Hemochromatosis and Hepatic Cirrhosis : Case Report and Review of the Literature." *Medical Mycology* 48(May): 518–27.
- Martin-Pena, A., M. Aguilar-Guisado, I. Espigado, and J. M. Cisneros. 2014. "Combination Therapy for Invasive Aspergillosis." *Clinical Infectious Diseases* (1): 1–25.
- Merkel, Simone, Daiane Heidrich, Chris Krebs, and Maria Lúcia. 2018. "Drosophila Melanogaster as a Model for the Study of Malassezia Pachydermatis Infections." *Veterinary Microbiology* 224(August): 31–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.021>.
- Moriello, Karen A. 2017. "In Vitro Efficacy of Shampoos Containing Miconazole, Ketoconazole, Climbazole or Accelerated Hydrogen Peroxide against Microsporum Canis and Trichophyton Species." *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19(4): 370–74.
- Moriello, Karen A., Kimberly Coyner, Susan Paterson, and Bernard Mignon. 2017. "Diagnosis and Treatment of Dermatophytosis in Dogs and Cats.: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology." *Veterinary Dermatology* 28(3): 266–68.
- Moriello, Karen A., and Maria Verbrugge. 2007. "Use of Isolated Infected Spores to Determine the Sporocidal Efficacy of Two Commercial Antifungal Rinses against Microsporum Canis." *Veterinary Dermatology* 18(1): 55–58.
- Morris, S D et al. 2002. "Contact Dermatitis and Allergy Comparative Frequency of Patch Test Reactions to Topical Antibiotics." *British Journal of Dermatology* 146: 1047–51.
- Mueller, Ralf S., Kerstin Bergvall, Emmanuel Bensignor, and Ross Bond. 2012. "A Review of Topical Therapy for Skin Infections with Bacteria and Yeast." *Veterinary Dermatology* 23(4).
- Mussani, Farheen, David Poon, and Sandy Skotnicki-grant. 2013. "Systemic Contact Dermatitis to Topical Clioquinol / Hydrocortisone Combination Cream." *Dermatitis* 24(4): 196–97.
- Nair, Sweatha V et al. 2016. "Antimicrobial Activity of Plumbagin, a Naturally Occurring Naphthoquinone from Plumbago Rosea, against Staphylococcus Aureus and Candida Albicans." *International Journal of Medical Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.004>.

- Nam, Hyo-Seung, Tae-Young Kim, Suk-Hee Han, and Changbaig. Hyun. 2013. "Evaluation of Therapeutic Efficacy of Medical Shampoo Containing Terbinafine Hydrochloride and Chlorhexidine in Dogs with Dermatophytosis Complicated with Bacterial Infection." *Journal of Biomedical Research* 14: 154–59.
- Nenoff, Pietro, and Gabriele Ginter-. 2014. "Mycology – an Update . Part 1: Dermatophytoses : Causative Agents , Epidemiology and Pathogenesis." *Journal of the German Society of Dermatology*: 188–210.
- Nett, Jeniel E, and David R Andes. 2015. "Fungal Biofilms : In Vivo Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs." *Microbiology spectrum* 3(4): 1–13.
- O'Shaughnessy, Elizabeth M. et al. 2006. "Antifungal Interactions within the Triple Combination of Amphotericin B, Caspofungin and Voriconazole against *Aspergillus* Species." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(6): 1168–76.
- Odds, F. C. 1982. "Interactions among Amphotericin B, 5-Fluorocytosine, Ketoconazole, and Miconazole against Pathogenic Fungi in Vitro." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 22(5): 763–70.
- Odds, F. C. 2003. "Synergy, Antagonism, and What the Checkerboard Tells between Them." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52(1): 1–1.
- Ohnemus, U et al. 2007. "An Ex-Vivo Oral Mucosa Infection Model for the Evaluation of the Topical Activity of Antifungal Agents." *Mycoses* 51(1): 21–29.
- Oliveira, Amanda Gleyce de Lima et al. 2012. "Chorioallantoic Membrane Assays (HET-CAM and CAM-TBS): Alternative Tests for Performing Toxicological Evaluation of Products with Low Potential for Ocular Irritation." *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 71(1): 153–59.
- Oliveri, Valentina, and Graziella Vecchio. 2016. "8-Hydroxyquinolines in Medicinal Chemistry: A Structural Perspective." *European Journal of Medicinal Chemistry* 120: 252–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.007>.
- Patil, Akash, and Soumyajit Majumdar. 2017. "Echinocandins in Antifungal Pharmacotherapy." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 69: 1635–60.
- Peres, Nalu Teixeira de Aguiar, Fernanda Cristina Albuquerque Maranhão, Antonio Rossi, and Nilce Maria Martinez-Rossi. 2010. "Dermatophytes: Host-Pathogen Interaction and Antifungal Resistance." *Anais brasileiros de dermatologia* 85(5): 657–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152790>.
- Perrins, N., and R. Bond. 2003. "Synergistic Inhibition of the Growth in Vitro of *Microsporum Canis* by Miconazole and Chlorhexidine." *Veterinary Dermatology*

- 14(2): 99–102.
- Pippi, Bruna. *Análogos Da 8-Hidroxiquinolina Como Candidatos A Agentes Antimicóticos: Estudo Da Atividade Antifúngica, Mecanismos De Ação E Parâmetros Toxicológicos*. 2018. 254 folhas. Tese (Doutorado em Microbiologia do Ambiente) - Instituto De Ciências Básicas Da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.
- Pippi, Bruna et al. 2017. "Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design." *Medical Mycology* 55(7): 763–73.
- Pires, Carla Andréa Avelar et al. 2014. "Clinical, Epidemiological, and Therapeutic Profile of Dermatophytosis." *Anais Brasileiros de Dermatologia* 89(2): 259–64.
- Quatrin PM, Kaminski TFA, Berlitz SJ, Guerreiro ICK, Canto RFS, Fuentefria AM. *Ex vivo* nail infection as an effective preclinical method for screening of new topical antifungals. *J Mycol Med*. 2020;30(2):100938.
- Quatrin, Priscilla M, Daiane Flores Dalla Lana, Taís Fernanda Andrzejewski Kaminski, and Alexandre Meneghello Fuentefria. 2019. "Fungal Infection Models: Current Progress of Ex Vivo Methods." *Mycoses* 62(10): 860–73.
- Raad, Issam I. et al. 2015. "Clinical Experience of the Use of Voriconazole, Caspofungin or the Combination in Primary and Salvage Therapy of Invasive Aspergillosis in Haematological Malignancies." *International Journal of Antimicrobial Agents* 45(3): 283–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.08.012>.
- Racz, Peter I et al. 2017. "Toxicology in Vitro Application of Caenorhabditis Elegans (Nematode) and Danio Rerio Embryo (Zebra Fi Sh) as Model Systems to Screen for Developmental and Reproductive Toxicity of Piperazine Compounds." *Toxicology in Vitro* 44(May): 11–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.002>.
- Ramage, Gordon et al. 2012. "Fungal Biofilm Resistance." *International Journal of Microbiology*: 1–14.
- Revie, Nicole M, Kali R Iyer, Nicole Robbins, and Leah E Cowen. 2018. "ScienceDirect Antifungal Drug Resistance : Evolution , Mechanisms and Impact." *Current Opinion in Microbiology* 45(Figure 2): 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.005>.
- Rosso, James Q D E L. 2014. "Onychomycosis and the Emergence of Newer Agents." *Clinical Aesthetic* 7(7): 10–18.
- Sahoo, AlokKumar, and Rahul Mahajan. 2016. "Management of Tinea Corporis, Tinea

- Cruris, and Tinea Pedis: A Comprehensive Review." *Indian Dermatology Online Journal* 7(2): 77.
- Salehi, Zahra, Masoomah Shams-Ghahfarokhi, and Mehdi Razzaghi-Abyaneh. 2018. "Antifungal Drug Susceptibility Profile of Clinically Important Dermatophytes and Determination of Point Mutations in Terbinafine-Resistant Isolates." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 37(10): 1841–46.
- Sanguino, Talita Carla, Isabele Carrilho Jarros, and Melyssa Negri. 2019. "Occurrence of Dermatophytoses in Patients from the Sistema Único de Saúde." *Anais Brasileiros de Dermatologia* 94(3): 293–97.
- Santos, Daniel A., and J. S. Hamdan. 2006. "In Vitro Antifungal Oral Drug and Drug-Combination Activity against Onychomycosis Causative Dermatophytes." *Medical Mycology* 44(4): 357–62.
- Scher, R. K., and R. Baran. 2003. "Onychomycosis in Clinical Practice: Factors Contributing to Recurrence." *British Journal of Dermatology*, 149: 5–9.
- Scorzoni, L. et al. 2017. "Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis." *Frontiers Microbiology* 8(36): 1–23.
- Scorzoni, Liliana et al. 2016. "Searching New Antifungals: The Use of in Vitro and in Vivo Methods for Evaluation of Natural Compounds." *Journal of Microbiological Methods*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.005>.
- Sharma, Priyanka, Mala Bhalla, Gurvinder P Thami, and Jagdish Chander. 2019. "Evaluation of Efficacy and Safety of Oral Terbinafine and Itraconazole Combination Therapy in the Management of Dermatophytosis." *Journal of Dermatological Treatment* 0(0): 1–5. <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1612835>.
- Shrestha, Sanjib K., Marina Y. Fosso, and Sylvie Garneau-Tsodikova. 2015. "A Combination Approach to Treating Fungal Infections." *Scientific Reports* 5: 1–11. <http://dx.doi.org/10.1038/srep17070>.
- Sims-McCallum, Rosalyn P. 2003. "Triple Antifungal Therapy for the Treatment of Invasive Aspergillosis in a Neutropenic Pediatric Patient." *American Journal of Health-System Pharmacy* 60(22): 2352–56.
- Singulani, Junya L et al. 2018. "Applications of Invertebrate Animal Models to Dimorphic Fungal Infections." *Journal of fungi* 4(118).
- Souza, Silva, Carin De Andrade, and Ana Elisa Kiszewski. 2016. "Case Report Dermatophytosis Caused by *Microsporum Gypseum* in Infants: Report of Four

- Cases and Review of the Literature.” *Anais Brasileiros de Dermatologia* 91(6): 823–25.
- Stein, Claudia et al. 2015. “Three Dimensional Checkerboard Synergy Analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against Multidrug-Resistant Clinical *Klebsiella Pneumonia* Isolates.” *PLoS ONE* 10(6): 1–17.
- Subissi, Alessandro, Daniela Monti, Giuseppe Togni, and Federico Mailland. 2010. “Ciclopirox: Recent Nonclinical and Clinical Data Relevant to Its Use as a Topical Antimycotic Agent.” *Drugs* 70(16): 2133–52.
- Tamura, Takashi et al. 2014. “In Vitro Susceptibility of Dermatophytes Agents to Six Antifungal Drugs and Evaluation by Fractional Inhibitory Concentration Index of Combined Effects of Amorolfine and Itraconazole in Dermatophytes.” *Microbiology and Immunology* 58(1): 1–8.
- Tartor, Yasmine H., Marwa E. Abo Hashem, and Shymaa Enany. 2019. “Towards a Rapid Identification and a Novel Proteomic Analysis for Dermatophytes from Human and Animal Dermatophytosis.” *Mycoses* 62(12): 1116–26.
- Tascini, C. et al. 2003. “Caspofungin in Combination with Itraconazole and Amphotericin B for the Treatment of Invasive Aspergillosis in Humans, with a Method to Test Ex Vivo Synergism [1].” *Clinical Microbiology and Infection* 9(8): 901–2. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00688.x>.
- Weitzman, Irene, and Richard C. Summerbell. 1995. “The Dermatophytes.” *American Society for Microbiology* 8(2): 240–59.
- White, Theodore C. et al. 2014. “Fungi on the Skin: Dermatophytes and *Malassezia*.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4(8).
- Wu, Lung-Chi, Pei-Lun Sun, and Yun-Ting Chang. 2013. “Extensive Deep Dermatophytosis Cause by *Trichophyton Rubrum* in a Patient with Liver Cirrhosis and Chronic Renal Failure.” *Mycopathologia* 176: 457–62.
- Yu, C., Zhou, J., & Liu, J. (2010). *Tinea incognito due to microsporum gypseum*. *Journal of Biomedical Research*, 24(1), 81–83.
- Zanette, Régis A, Janio M Santurio, Erico S Loreto, and Sydney H Alves. 2013. “Toll - Deficient *Drosophila* Is Susceptible to *Pythium Insidiosum* Infection.” *Microbiology and Immunology* 57: 732–35.

10. APÊNDICES

10.1 Artigo 1

O artigo intitulado “*In vitro* antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine” foi aceito na revista *Mycoses*, na qualidade de “Artigo Original”.

Title: *In vitro* antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine

Short title: Antidermatophytic synergism using clioquinol

Bárbara da Costa^{1*}, Bruna Pippi², Taís Fernanda Andrzejewski Kaminski³, Saulo F. Andrade^{1,3}, Alexandre Meneghello Fuentefria^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

***Address for correspondence:**

Bárbara da Costa

Laboratory of Applied Mycology, School of Pharmacy, Annex II, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, São Luís, 154, Santana, 90620-170, Porto Alegre – RS, Brazil;

Telephone: +55 51 3308 2194; E-mail address: basdacosta@hotmail.com

Abstract

Background: Dermatophytosis are the most frequent fungal infections worldwide and there have been described clinical resistance to the commonly used antifungals. Clioquinol is an antimicrobial that had the oral formulations withdrawn from the market in the 70's due report of neurotoxicity and recently has been considered as an effective alternative for treatment of dermatophytosis. **Objectives:** To evaluate the effect of the double and triple association between clioquinol with terbinafine and ciclopirox on clinical isolates of dermatophytes. The cytotoxicity of these associations on human leukocytes was also verified. **Methods:** Checkerboard method was used to evaluate the interaction between antifungal agents. Time kill assay were used to verify fungicidal action and evaluate the combination with greater effect for TRU47 isolate. Cell viability was assessed by loss of integrity of the leukocyte membrane in order to verify the toxicity. **Results:** Synergistic interaction was observed in 42% of isolates when terbinafine was associated with clioquinol and in 50% of isolates when ciclopirox was associated with clioquinol. The triple association resulted in synergistic interaction for 75% of the isolates. Clioquinol + terbinafine and triple combination were more effective for TRU47 isolate and the combinations exhibited a time-dependent fungicidal effect. Furthermore, the results of cell viability demonstrated that clioquinol and terbinafine combination are not cytotoxic to human leukocytes. **Conclusions:** Clioquinol in combination with antifungals in the treatment of dermatophytosis can be a therapeutic strategy to overcome problems related to resistance, action spectrum and toxicity of the antifungal drugs used in the clinic.

Keywords: dermatophytes, synergism, clioquinol, terbinafine, ciclopirox.

1. Introduction

The cutaneous mycoses, mainly caused by dermatophyte fungi, are among the most common fungal infections worldwide, affecting several age groups and adversely affecting the quality of life of infected patients. Although these dermatoses are not serious in terms of mortality and morbidity, they cause substantial discomfort to patients. It is estimated that superficial fungal infections affect roughly 20-25% of the world population.^{1,2}

Dermatophytes are fungi that invade and multiply within keratinized tissues (skin, hair, and nails) causing infection and are mainly represented by the genera *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Arthroderma*, *Lophophyton* and *Nannizzia*^{3,4,5} Symptoms may be mild or severe based on the host's immunologic condition. Typical lesions of skin infection are circular, erythematous and pruritic, and are the result of direct action of the fungus or hypersensitivity reactions to the microorganism and/or its metabolic products.^{1,6} These mycoses are highly contagious diseases that can be transmitted to animals and human, especially pregnant women, young children, elderly people and immunocompromised individuals.⁷

The main antifungal agents used for the treatment of dermatophytoses are terbinafine, ciclopirox and griseofulvin.^{2,8,9} However, there have been reports of clinical resistance to these antifungals and significant liver toxicity for some drugs such as terbinafine.^{1,8,10} Furthermore, dermatophytosis are often associated with recurrence after discontinuation of antifungal therapy. In the absence of effective monotherapy, combined therapies are being clinically used as therapeutic strategy.¹¹ Potential benefits of combination therapy with antifungals include: overcoming of fungal resistance, expansion of the action spectrum, improvement of the clinical efficacy of drugs and reduction of the doses administered resulting in lower toxicity and decrease of side effects in the host.^{11,12,13}

Clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) is a dihalogenated 8-hydroxyquinoline which was widely used in human medicine from the 1950s to 1970s as an oral antiparasitic agent and for skin infections. In the 1970s oral clioquinol was withdrawn from the market due to reports of neurotoxicity in Japanese patients. However, topical formulations of clioquinol are still available.¹⁴ Properties such as antifungal, bactericidal and antiproliferative agent have been reported for clioquinol and others 8-hidroxiquinoline derivatives.¹⁵ Current studies have shown that clioquinol

inhibits effectively *Candida* spp. and dermatophytes with rare reports of resistance.¹⁶

In this context, the aim of the present study was to evaluate the effect of the double association between clioquinol with terbinafine and ciclopirox against clinical isolates of dermatophytes, as well as a triple association of these agents. The cytotoxicity of these association on human leukocytes was also verified.

2. Material and methods

2.1 Fungal Isolates

A total of 12 isolates were included in this study: *N. gypsea* (early classified *M. gypseum*) (3), *M. canis* (3), *T. mentagrophytes* (3) and *T. rubrum* (3). All strains were deposited in the Mycology Collection of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil) and originated from the National Programme of Quality Control of Brazil, nail and skin scrapes.

2.2 Antifungal compounds

The drugs for this study were prepared according to CLSI recommendations (protocol M38-A2). The stock solutions for clioquinol (Sigma-Aldrich, USA), ciclopirox (Sigma-Aldrich, USA) and terbinafine (Sigma-Aldrich, USA) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, USA) (Figure 1). For the experiments, the compounds were diluted in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) to obtain a maximum concentration of 1% DMSO.

2.3 Antifungal susceptibility testing

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the antifungal agents clioquinol, ciclopirox and terbinafine for the all isolates were determined by the broth microdilution method according protocol M38-A2.¹⁷ Two-fold serial dilutions were realized in RPMI 1640 medium and the concentration tested were in the range of: 0.0156 – 8.0 µg/mL for clioquinol, 0.06-32 µg/mL for ciclopirox and 0.001-0.5 µg/mL for terbinafine as CLSI recommends. The concentrations established as MIC were those that showed 100% inhibition of lineage growth in five days of incubation at 32°C.

2.4 Checkerboard assay

The interaction of clioquinol with ciclopirox and terbinafine was evaluated for the

all isolates using the checkerboard method.¹⁸ The concentrations tested varied from: MIC/8, MIC/4, MIC/2, MIC, MICx2, MICx4 and MICx8 for each antifungal compound, resulting in 49 combinations. The experiments were performed in triplicate and incubated at 32°C for 5 days.

The effect of the interaction was defined quantitatively as a fractional inhibitory concentration index (FICI) expressed as the sum of the fractional inhibitory concentrations (FIC), as defined by the following equation:

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_A \text{ in combination}}{MIC_A \text{ tested alone}} + \frac{MIC_B \text{ in combination}}{MIC_B \text{ tested alone}}$$

Synergism was defined when $FICI \leq 0.5$, indifference when $0.5 < FICI \leq 4$ and antagonism when $FICI > 4$.¹⁹

2.5 Three-Dimensional Checkerboard

The three-dimensional checkerboard assay combining clioquinol, terbinafine and ciclopirox was performed according to Stein et al. (2015)²⁰, with slight modifications. The wells of a microwell plate were filled with 100 ul of solution of the three antifungal agents in different combinations of concentrations and 100 ul of the fungal suspensions. For each isolate and antifungal agent the selected concentration ranges depended on previously determined MICs, as showed in scheme 1. The concentrations tested varied from: MIC/8, MIC/4, MIC/2, MIC and MICx2 for each antifungal compound, establishing in total 125 combinations. The microwell plates were incubated at 32°C for 5 days and the experiment was realized in duplicate.^{20,21} The fractional inhibitory concentration index (FICI) for triple antifungal combination was calculated as follows:

$$FICI = FIC_A + FIC_B + FIC_C = \frac{MIC_A \text{ in combination}}{MIC_A \text{ tested alone}} + \frac{MIC_B \text{ in combination}}{MIC_B \text{ tested alone}} + \frac{MIC_C \text{ in combination}}{MIC_C \text{ tested alone}}$$

Synergism was defined when $FICI \leq 0.75$, indifference when $0.75 < FICI \leq 4$ and antagonism when $FICI > 4$.²²

2.6 Time Kill Assay

The time kill assay was performed with a representative strain of *T. rubrum* (TRU47) which presented synergistic effect when tested with all combinations of

antifungal agents (clioquinol + ciclopirox, clioquinol + terbinafine and clioquinol + ciclopirox + terbinafine). The assay was performed as described by Ghannoum et al. (2013) with modifications.²³ The concentrations tested were: MICs of antifungals agents alone (clioquinol at 1.0 µg/mL; ciclopirox at 2.0 µg/mL; and terbinafine at 0.250 µg/mL), MICs obtained in double combination (clioquinol at 0.125 µg/mL; ciclopirox at 0.500 µg/mL; and terbinafine at 0.03125 µg/mL), MICs obtained in triple combination (clioquinol at 0.125 µg/mL; ciclopirox at 0.250 µg/mL; and terbinafine at 0.03125 µg/mL) and the synergistic associations (clioquinol at 0.125 µg/mL + ciclopirox at 0.500 µg/mL; clioquinol at 0.125 µg/mL + terbinafine at 0.03125 µg/mL; and clioquinol at 0.125 µg/mL + ciclopirox at 0.250 µg/mL + terbinafine at 0.03125 µg/mL). The experiments were performed in triplicate and incubated at 32°C. At predetermined time points (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h), an aliquot was removed from each tube and serially diluted until 10⁻² with sterile water. Then, an aliquot was removed from the test solution and from dilutions and seeded with the help of the Drigalsk spreader on Sabouraud dextrose agar plates with chloramphenicol. After incubation at 32°C for 96 h the colonies were counted for determination of log₁₀ CFU/mL.

Fungicidal effect was considered when there was ≥ 99.9% decrease in the log₁₀ of the number of CFU/ml compared with starting inoculum and the count of the CFU were used to verify which treatment was more efficient. Statistical analysis was performed with Two-way ANOVA as well as Tukey's multiple comparisons test (GraphPad Prism software; version 6.0;). P < 0.05 was considered statistically significant

2.7 Cytotoxicity

Cell culture was prepared using 1 mL of venous blood collected by venipuncture of an adult volunteer having over 18 years of non-use of medication (All the consents, procedures and documents were approved by Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Ethical Committee under authorization number 666.655/2014). Lymphocytes obtained by centrifugation gradient were transferred to the culture medium containing 9 mL of RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicillin. Cell culture flasks were stoved at 37 °C for 72 hours according Santos Montagner et al. (2010). The concentrations tested are the same as the time kill assay.

Cell viability was assessed by loss of integrity of the leukocyte membrane using

the trypan blue dye according to Burow et al. (1998). The method uses leukocytes that are submitted to the Turk reagent and an aliquot is visualized in the Neubauer chamber (400X magnification). Dead cells acquire blue staining, differently from living cells. A total of 300 cells were counted.

3. Results

In the antifungal susceptibility test the range of concentrations obtained was: 0.5 - 2.0 µg/mL for clioquinol, 1.0 - 4.0 µg/mL for ciclopirox and 0.016 - 0.500 µg/mL for terbinafine. The results obtained from the double and triple checkerboard are presented in Table 1. Synergistic interaction was observed in 42% of isolates when terbinafine was associated with clioquinol and in 50% of isolates when ciclopirox was associated with clioquinol. The triple association resulted in synergistic interaction for 75% of the isolates. No case of antagonism was observed. All combinations tested have synergistic effect on the TRU47 isolate.

The antifungal agents (MIC) as well as the double and triple associations exhibited a time-dependent fungicidal effect on TRU47 (Figure 2). Clioquinol (MIC: 1.0 µg/mL) showed fungicidal effect (> 99.9% reduction in CFU) at 96 h, terbinafine (MIC: 0.25 µg/mL) at 72h and ciclopirox (MIC: 2.0 µg/mL) at 120 h. For clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) combination and clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL) combination, this effect was observed at 48 h and 120 h, respectively. For clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) association, the fungicidal effect was observed at 96h (Figure 3). As expected, the sub-inhibitory concentrations of the antifungal agents did not show fungicidal activity at any time (Figure 2B).

The results of cell viability demonstrated that clioquinol + terbinafine are not cytotoxic to human leukocytes since this group showed no statistical difference compared to the control without treatment, unlike the combination of clioquinol + ciclopirox and the triple combination where there is significant difference. Ciclopirox in the MIC (2.0 µg/mL) also demonstrated statistical difference when compared to the control without treatment (Figure 4).

4. Discussion

Several authors have demonstrated the beneficial interactions between different antifungal agents.^{11,24,25,26} Double and triple associations using clioquinol showed synergistic effect in the present study and this complex interaction can be explained by the fact that each of the three drugs has simultaneous effect on different targets. The antifungal mechanism of action of clioquinol is not well understood but recently Pippi et al. (2018) observed that it acts on the cell wall of dermatophytes. On the other hand, ciclopirox acts intracellularly.²⁷ The high affinity of ciclopirox for trivalent cations, such as Fe^{3+} , inhibits metal-dependent enzymes and affects the energy production in the electron transport chains in the mitochondria, absorption of nutrients and synthesis of proteins and nucleic acids.²⁸ In contrast, terbinafine inhibits the squalene epoxidase, an enzyme involved in ergosterol biosynthesis.^{29,30,31}

So, an action on the cell wall of dermatophytes caused by clioquinol can facilitate the penetration of terbinafine and/or ciclopirox into the cell increasing the amount of available intracellular drug to exert its effect. This event can result in rapid death of the cell in lower doses of antifungals and justifies the synergistic interactions from the combinations evaluated here. In addition, the higher frequency of triple synergism compared to both double synergisms may be related to increased influx of ciclopirox as a result of permeability changes in the fungal cell membrane caused by decreased amount of ergosterol by terbinafine effect.

There are little data available on triple antifungal combinations. Dannaoui et al. (2004) and O'Shaughnessy et al. (2006) reported *in vitro* synergistic combination of caspofungin + flucytosine + amphotericin B and caspofungin + flucytosine + voriconazole for *Aspergillus* spp., respectively. Odds F (1982) also described synergism for triple combination.^{22,32,33} They observed that amphotericin B + flucytosine + miconazole or ketoconazole was synergistic for *Candida* spp. and *A. fumigatus*.

In humans, there are few case reports of successful outcome with triple antifungal therapy. Tascini et al. (2003) described a successful treatment with amphotericin B + itraconazole + caspofungin and Sims-McCallum (2003) reported a treatment with amphotericin B + caspofungin + voriconazole, both in

patients with aspergillosis.^{34,35} For dermatophytic fungi, triple interaction studies have not yet been found in the literature to date.

Checkerboard assay demonstrated that the triple combination increased the action spectrum compared to double combinations since larger numbers of isolates were susceptible when all three antifungals were associated. However, checkerboard method not taken into account the dynamic changes in growth and susceptibility over the studied time.^{36,37} So, time kill curves were used to obtain detailed information about the antifungal efficacy as a function of both time and concentration/association. Clioquinol, ciclopirox and terbinafine demonstrated fungicidal effect depending on the concentration and exposure time (figure 1A) as well as previously reported by Pippi et al. (2017), Kaur & Kakkar (2012) and Subisse et al. (2010), respectively.^{16,37,38}

Statistical analysis demonstrated that clioquinol + terbinafine and triple combination presented no difference between them for TRU 47 isolate. So, the addition of ciclopirox did not appear to influence in the antifungal effect of the associations for this isolate. Besides that, they were more effective than clioquinol + ciclopirox combination.

In addition, terbinafine + clioquinol combination was statistically better than all antifungals tested in their MICs and this combination showed a fungicidal effect faster than all other treatments (48 h). The triple combination also was statistically better than the MIC of clioquinol and ciclopirox, and showed no difference to MIC of terbinafine. However, the triple combination has the advantage of presenting a low dose of terbinafine (eight times lower than MIC) and increasing the spectrum of action. On the other hand, clioquinol + ciclopirox combination present less effect than the MIC of terbinafine and clioquinol, and there was no significant difference to MIC of ciclopirox. Despite the lower effect than antifungals alone, it is important to note that the concentrations used in the clioquinol + ciclopirox combination are eight times lower than the MIC of clioquinol and four times lower than the MIC of ciclopirox. Cell viability results corroborate what was reported in the time kill assay, demonstrating that the double association of clioquinol + terbinafine seems to present the best results, since it was not toxic in human leukocytes. Pinto et al. 2019 demonstrated that terbinafine at a concentration of 0.3 µg/mL exhibits cytotoxicity in VERO cell culture.³⁹ Thus, the results obtained

here are highly relevant since low concentrations of antifungal agents were combined and better action and less toxicity were obtained

This research shows a field to be explored since the results found are motivating and the effect of clioquinol in combination with antifungal drugs is an unprecedented finding

The results found in the present study are of great value due failure to respond to therapy and high relapse rates point to the need for a shift in the approach of dermatophytosis treatment.⁴⁰ Clinical reports suggest that combination between oral and topical antifungal agents (eg, topical ciclopirox and oral terbinafine or topical morolfine and terbinafine oral), administered for a shorter period of time compared with the standard regimen, may results in cure rates as good as or better than the indicated oral monotherapy regimen. Drug penetration to different parts of the nail or skin and complimentary mechanisms of action may contribute to the success of combination therapy.^{41,42} Furthermore, ciclopirox and terbinafine combination also demonstrated synergy against various non-dermatophyte strains.³⁶ However, the pharmacokinetics of the use of cliouquinol associated with terbinafine e ciclopirox has not yet been described. Therefore in vivo studies are necessary to safely establish the use of these associations.

Finally, the triple association and double association between clioquinol + terbinafine appear to be the best choice to treat dermatophytosis. Clioquinol + terbinafine combination has the advantage of arriving the fungicidal effect more quickly and it's not cytotoxic, and is so active when the triple combination, not requiring ciclopirox to achieve the same effect. On the other hand, the triple association increased the action spectrum.

In this context the inclusion of clioquinol in combination with antifungals in the treatment of dermatophytosis can be an important therapeutic strategy to overcome problems related to resistance, action spectrum and toxicity of the current antifungal drugs used in the medical clinic.

5. Conflict of interest

No conflict of interest declared.

6. Reference

1. Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol.* 2010;85(5):657-67.
2. Pires CAA, Cruz NFS, Lobato AM, Sousa PO, Carneiro FRO, Mendes AMD. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *An Bras Dermatol.* 2014;89(2):259-64.
3. Sahoo and Mahajan. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatology Online Journal* - March-April 2016 - Volume 7 - Issue 2
4. Weitzman and Summerbell. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 1995, p. 240–259 Vol. 8, No. 2
5. De Hoog, G. S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., ... Gräser, Y. (2016). Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, 182(1-2), 5–31
6. Degreeef, H. Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection). *Mycopathologia* (2008) 166:257–265.
7. Moriello A, Coyner K, Paterson S and Mignon B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. *Veterinary Dermatology* 2017; 28: 266–e68
8. White TC, Findley K, Dawson TL, et al. Fungi on the Skin: Dermatophytes and Malassezia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a019802
9. Dalla Lana A, Pippi B, Carvalho A, et al. In Vitro additive effect on griseofulvin and terbinafine combinations against multidrug-resistant dermatophytes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2018;54(2): e17149
10. Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, Shaw D, Mushtaq K, Paul RA, Narang T, Chakrabarti A. Mutation in the squalene epoxidase gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* associated with allylamine resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2018. 62 (5), e:02522-17

11. Fuentefria A, Pippi B, Dalla Lana D, Donato K and De Andrade S. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Letters in Applied Microbiology*. 2017, 66, 2—13
12. Hatipoglu N and Hatipoglu H. Combination antifungal therapy for invasive fungal infections in children & adults. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2013. 11(5), 523-535
13. Shrestha, S. K, Fosso M, Garneau-Tsodikova S. A combination approach to treating fungal infections. *Scientific Report*. 2015. 5, 17070
14. Mao, X., & Schimmer, A. The toxicology of Clioquinol. *Toxicology Letters*, 2008, 182(1-3), 1–6.
15. V. Oliveri, G. Vecchio. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;120:252-274.
16. Pippi B, Reginatto P, Machado GDR, et al. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Med Mycol*. 2017;55(7):763-773
17. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-A3. *Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008*.
18. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR and Rex JH. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Mar. 2004, p. 693-715 Vol. 48, No. 3
19. Odds, F.C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003. 52, 1.
20. Stein, C., Makarewicz, O., Bohnert, J. A., Pfeifer, Y., Kesselmeier, M., Hagel, S., & Pletz, M. W. (2015). *Three Dimensional Checkerboard Synergy Analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against Multidrug-Resistant Clinical Klebsiella pneumonia Isolates*. *PLOS ONE*, 10(6), e0126479
21. Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi Najafi, M. B., & Farhoosh, R. (2017). *Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit*. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 285–294

22. O'Shaughnessy E., Meletiadiis J., Stergiopoulou T, Demchok J and Walsh T. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2006) 58, 1168–1176
23. Ghannoum M, Isham N, Verma A, Plaum S, Fleischer AJ, Hardas B. In Vitro Antifungal Activity of Naftifine Hydrochloride against Dermatophytes. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (9): 4369–4372.
24. Chang, Y.-L., Yu, S.-J., Heitman, J., Wellington, M., & Chen, Y.-L. New facets of antifungal therapy. *Virulence*, 2016, 8(2), 222–236.
25. Martin-Pena, A., Aguilar-Guisado, M., Espigado, I., & Cisneros, J. M. Antifungal Combination Therapy for Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 2014, 59(10), 1437–1445.
26. Hill, J. A., & Cowen, L. E. Using combination therapy to thwart drug resistance. *Future Microbiology*, 2015, 10(11), 1719–1726.
27. Pippi B, Lopes W, Reginatto P et al. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharm J* 2018; doi: 10.1016/j.jsps.2018.07.017
28. Gupta AK, Paquet M, Simpson FC. Therapies for the treatment of onychomycosis. *Clinics in Dermatology*. 2013 31, 544–554
29. Danielli LJ, Pippi B, Duarte JA, et al. Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect in vitro with terbinafine and ciclopirox against dermatophytes. *Royal Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018, 70(9), 1216–1227.
30. Baddley J and Pappas P. Antifungal Combination Therapy: Clinical Potential. *Drugs* 2005; 65 (11): 1461-1480.
31. Salehi, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. Antifungal drug susceptibility profile of clinically important dermatophytes and determination of point mutations in terbinafine-resistant isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018, 37(10), 1841–1846
32. Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 970–8.

33. Odds FC. Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 763–70.
34. Tascini C, Tagliaferri E, Iapace R et al. Caspofungin in combination with itraconazole and amphotericin B for the treatment of invasive aspergillosis in humans, with a method to test ex vivo synergism. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 901–2.
35. Sims-McCallum RP. Triple antifungal therapy for the treatment of invasive aspergillosis in a neutropenic pediatric patient. *Am J Health Syst Pharm* 2003; 60: 2352–6.
36. Gupta, A. K., & Kohli, Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *British Journal of Dermatology*, 2003, 149(2), 296–305.
37. Kaur, I. P., & Kakkar, S. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010, 7(11), 1303–1327.
38. Subissi, A., Monti, D., Togni, G., & Mailland, F. Ciclopirox. *Drugs*, 2010, 70(16), 2133–2152.
39. Leal Pinto, Sandra Milena, Laura Viviana Herrera Sandoval, and Leonor Yamile Vargas. 2019. “In Vitro Susceptibility of *Microsporum* Spp. and Mammalian Cells to Eugenia Caryophyllus Essential Oil, Eugenol and Semisynthetic Derivatives.” *Mycoses* 62(1): 41–50
40. Scher, R. K., & Baran, R. (2003). Onychomycosis in clinical practice: factors contributing to recurrence. *British Journal of Dermatology*, 149(s65), 5–9. doi:10.1046/j.1365-2133.149.s65.5.
41. Gupta AK, Lynch LE. Management of onychomycosis: examining the role of monotherapy and dual, triple, or quadruple therapies. *Cutis*, 2004, 74(1), 5-9.
42. Evans, E. G. V. Drug synergies and the potential for combination therapy in onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 2003, 149(s65), 11–13.

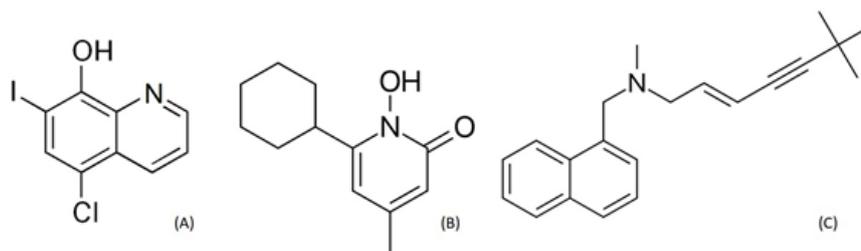
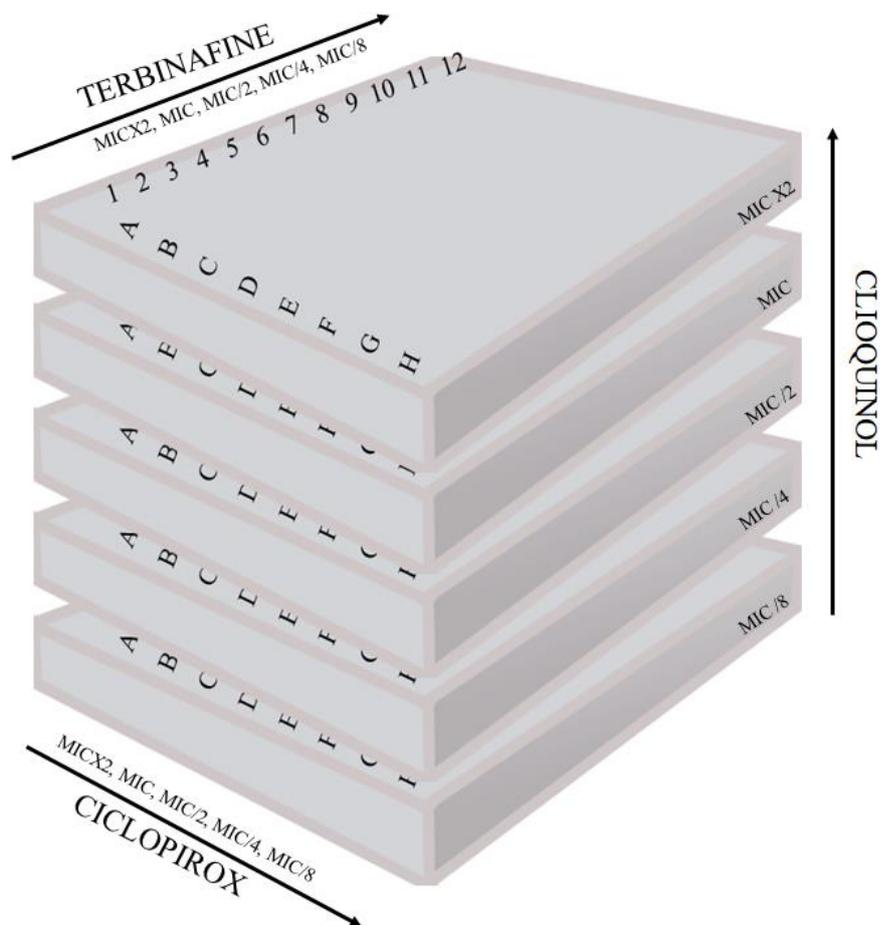


Figure 1. Chemical structure of clioquinol (A), ciclopirox (B) and terbinafine (C).



Scheme 1: Schematic representation of three-dimensional checkerboard technique using clioquinol, ciclopirox and terbinafine (da Costa, 2020).

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of clioquinol (CQ), ciclopirox (CP) and terbinafine (TB) tested alone and in combination against dermatophytes.

ISOLATES	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			MIC combination ($\mu\text{g/mL}$) Clioquinol + Ciclopirox				MIC combination ($\mu\text{g/mL}$) Clioquinol + Terbinafine				MIC combination ($\mu\text{g/mL}$) Clioquinol + Ciclopirox + Terbinafine				
	CQ	CP	TB	CQ	CP	FICI	INTER	CQ	TB	FICI	INTER	CQ	CP	TB	FICI	INTER
TRU45	0.500	2.0	0.0625	0.250	0.250	0.625	IND	0.125	0.155	0.500	SYN	0.125	0.500	0.0156	0.750	SYN
TRU47*	1.0	2.0	0.500	0.125	0.500	0.375	SYN	0.125	0.0625	0.250	SYN	0.125	0.250	0.03125	0.312	SYN
TRU51	1.0	2.0	0.500	0.500	0.250	0.625	IND	0.125	0.125	0.375	SYN	0.0625	0.250	0.0625	0.312	SYN
TME60	1.0	1.0	0.062	1.0	1.0	1.250	IND	1.0	0.0077	1.125	IND	0.0625	0.250	0.0312	0.625	SYN
TME16	0.5	1.0	0.500	0.500	0.250	1.250	IND	0.0625	0.250	0.375	SYN	0.0625	0.125	0.0625	0.375	SYN
TME32	1.0	2.0	0.0625	0.250	0.125	0.375	SYN	0.500	0.001	0.516	IND	0.250	0.250	0.0156	0.625	SYN
MCA01	1.0	2.0	0.500	0.125	0.250	0.375	SYN	0.0625	0.248	0.625	IND	0.125	0.500	0.125	0.625	SYN
MCA29	1.0	4.0	0.008	0.250	0.125	0.281	SYN	0.250	0.001	0.375	SYN	0.250	2.0	0.002	1.0	IND
MCA33	1.0	4.0	0.0625	0.250	2.0	0.750	IND	0.0625	0.03125	0.625	IND	0.0625	1.0	0.0152	0.562	SYN
NGY42	1.0	2.0	0.0625	0.250	0.500	0.500	SYN	0.0625	0.03125	0.5625	IND	0.0625	1.0	0.0156	0.812	IND
NGY50	0.500	2.0	0.250	0.125	0.250	0.500	SYN	0.125	0.125	0.750	IND	0.125	0.500	0.125	1.0	IND
NGY58	1.0	2.0	0.125	0.0625	1.0	0.5625	IND	0.0625	0.125	1.0625	IND	0.125	0.250	0.0312	0.500	SYN

* Isolate submitted to time kill studies

FICI: fractional inhibitory concentration index; INTER: interaction; IND: indifferent; SYN: synergetic.

TRU: *Trichophyton rubrum*; TME: *Trichophyton mentagrophytes*; MCA: *Microsporum canis*; NGY: *Nanizzia gypsea*.

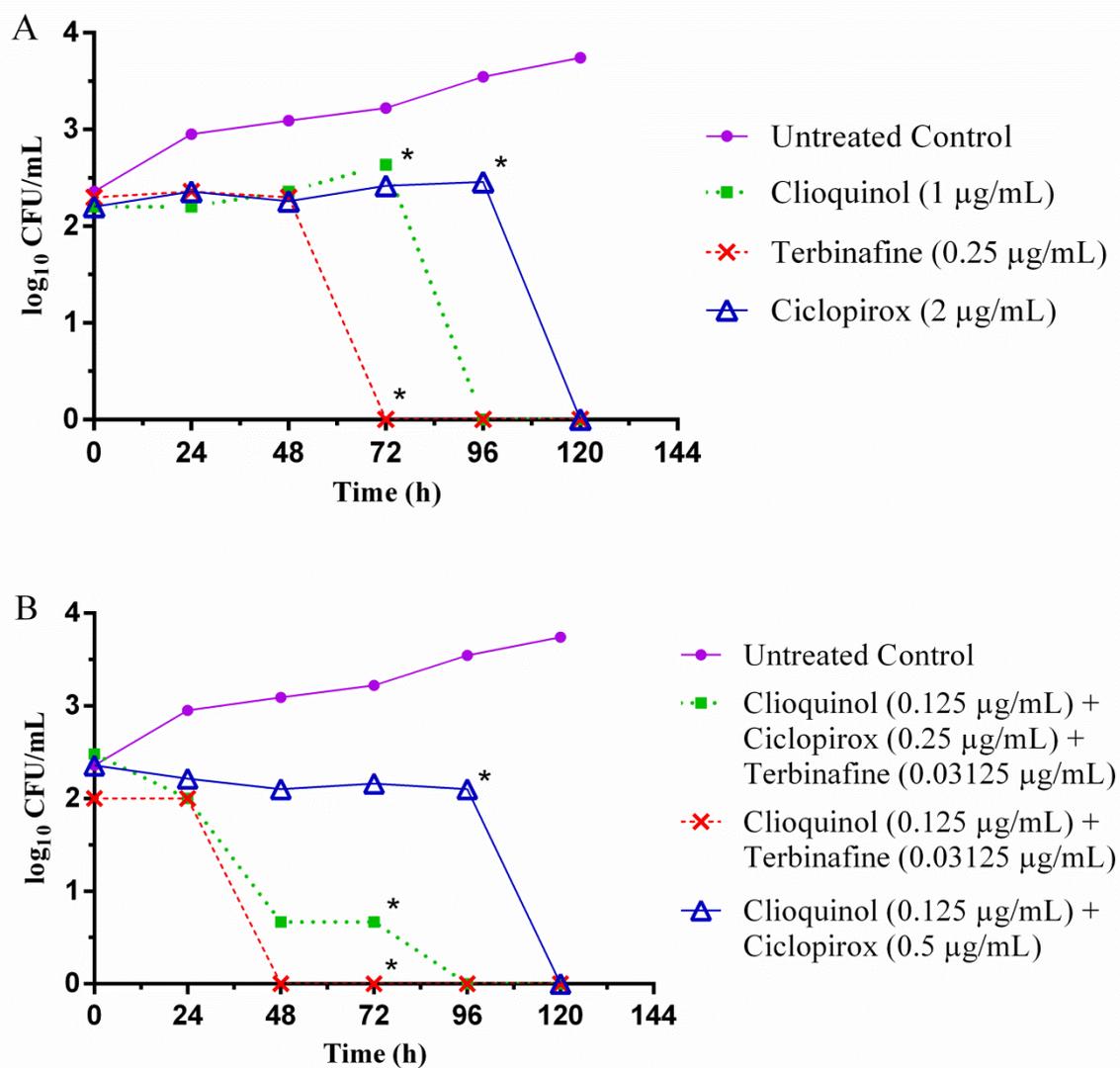


Figure 2. Time kill curve of clioquinol, terbinafine and ciclopirox in their MICs (A) and in double and triple combination (B) for TRU47 isolate. The asterisks indicate statistical difference compared to the untreated control (* $p < 0.05$).

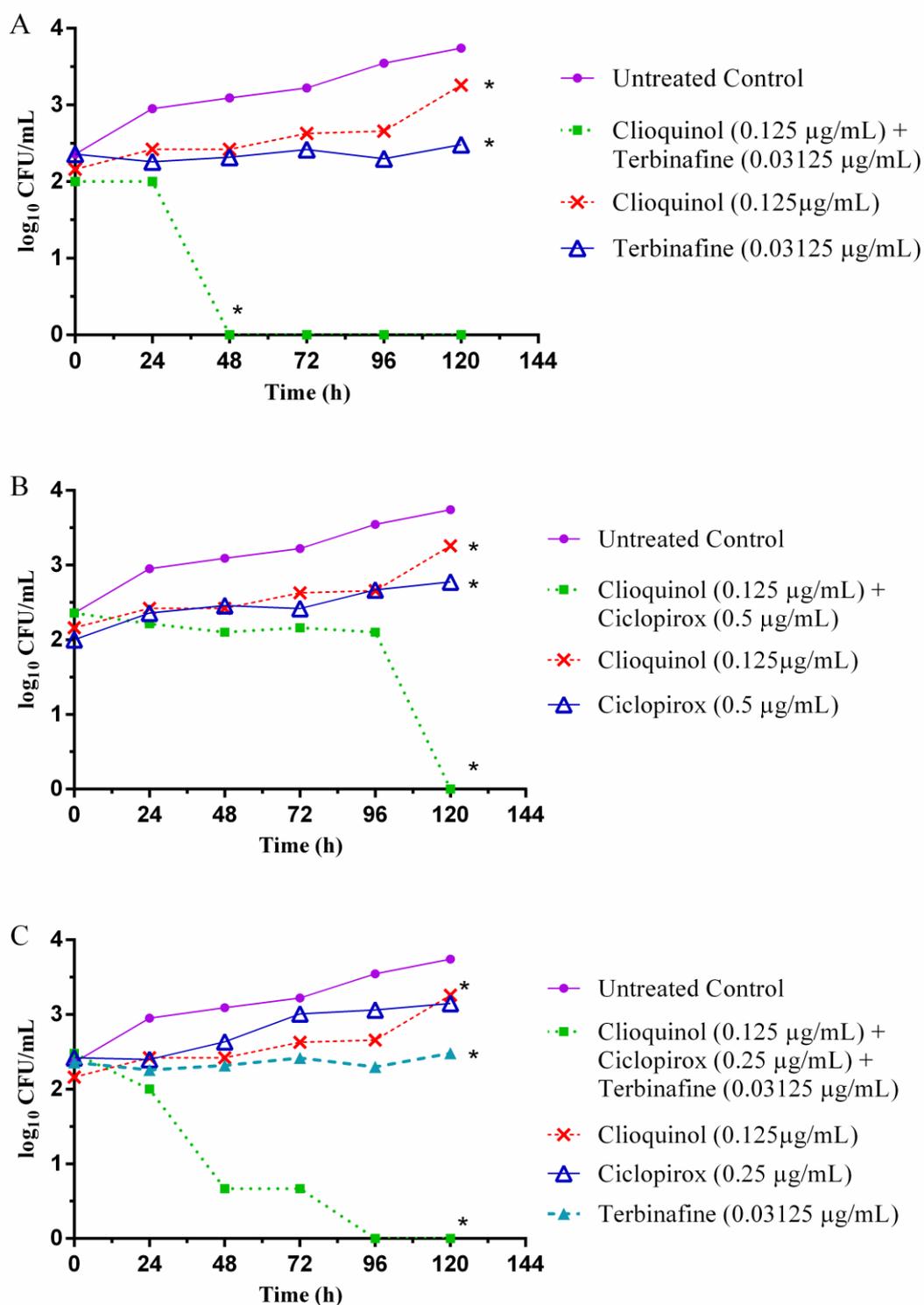


Figure 3: Time kill curve of the combinations between clioquinol + terbinafine (A), clioquinol + ciclopirox (B) and clioquinol + ciclopirox + terbinafine (C) compared with the antifungals agents alone in the same concentration for TRU47 isolate. The asterisks indicate statistical difference compared to the untreated control (* $p < 0.05$).

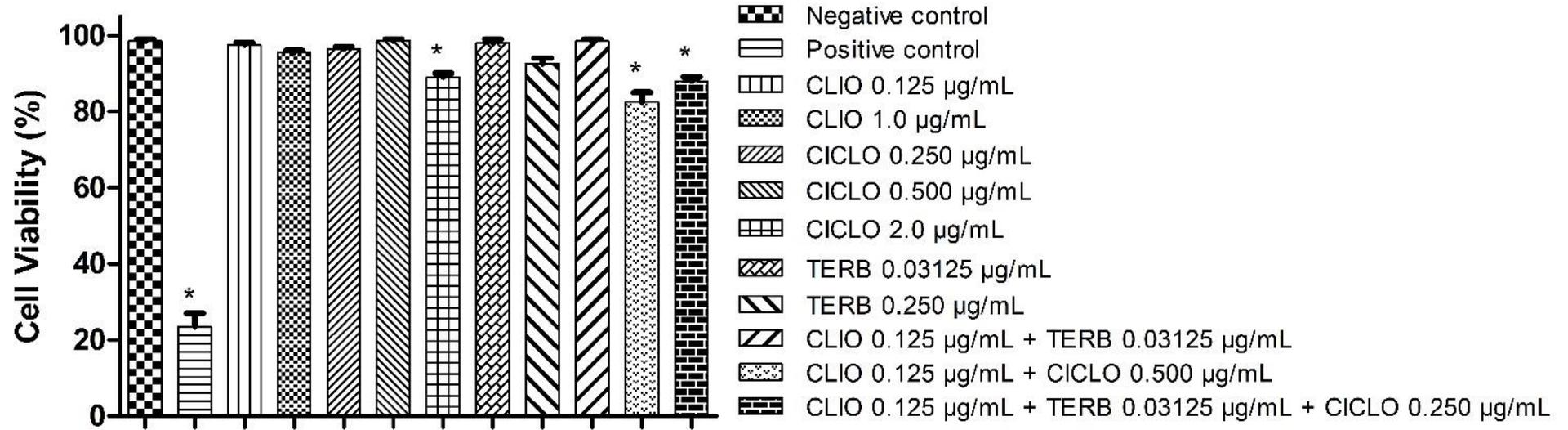


Figure 4. Graph of percent cell viability of cloiquinol, terbinafine and ciclopirox in their MIC and in double and triple combination. The asterisks indicate statistical difference compared to the untreated control (*p<0.05).

10.2 Artigo 2

O artigo intitulado “Evaluation of activity and toxicity of combining clioquinol with ciclopirox and terbinafine in alternative models of dermatophytosis.” será submetido na revista “*Journal of Medical Mycology*” na qualidade de “Artigo Original”.

Title: Evaluation of activity and toxicity of combining clioquinol with ciclopirox and terbinafine in alternative models of dermatophytosis.

Short title: Antidermatophytic activity of combining clioquinol with antifungals

Bárbara da Costa^{1, *}, Bruna Pippi², Simone Jacobus Berlitz³, Anderson Ramos Carvalho⁴, Mario Lettieri Teixeira⁵, Irene Clemes Külkamp-Guerreiro³, Saulo F. Andrade^{1,4}, Alexandre Meneghello Fuentefria^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁵Laboratório de Farmacologia, Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, Concórdia, Brazil.

***Address for correspondence:**

Bárbara da Costa

Laboratory of Applied Mycology, School of Pharmacy, Annex II, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, São Luís, 154, Santana, 90620-170, Porto Alegre – RS, Brazil;

Telephone: +55 51 3308 2194; E-mail address: basdacosta@hotmail.com

Abstract

Background: Dermatophytosis is a superficial fungal infection that affects humans and is very common in small animals. The treatment using the most commonly used antifungals is failing and new therapeutic alternatives are required to combat the resistance of these fungal infections. Previous studies by the group have shown that clioquinol is an important therapeutic alternative in the treatment of dermatophytosis.

Objectives: To conduct studies of antidermatophytic activity and the irritant potential from the double and triple combinations of clioquinol, terbinafine and ciclopirox in *ex vivo* and *in vivo* alternative models.

Methods: To evaluate the irritant potential of antifungal combinations, the alternative HET-CAM method was used, based on macroscopic changes to the membrane. *Ex vivo* models were used to assess the effectiveness of antifungal combinations, using pig hooves and veterinary fur. Any possible tissue damage was to assess through in histopathology of swine ears.

Results: The results of the HET-CAM showed that all combinations can be classified as non-irritating, corroborated by the results of the histopathological evaluation of the pig's ear skin. Only the double combinations managed to remove 100% of the colony forming units (CFU) formed on the pig's hooves. The clioquinol + terbinafine combination and the triple combination were more effective in eradicating the preformed biofilm in fur of veterinary origin.

Conclusions: These results show the potential of formulations of clioquinol in combination with antifungals for use in humans and in the veterinary field to combat dermatophytosis, as an important alternative therapy, for use in the near future.

Keywords: dermatophytes, *ex vivo*, *in vivo*, clioquinol, terbinafine, ciclopirox.

Lay summary

Evaluate the antidermatophytic activity and irritating potential of double and triple combinations of clioquinol, terbinafine and ciclopirox in alternative models. The results show the potential of clioquinol formulations in combination to combat dermatophytosis in humans and in veterinary field.

1. Introduction

Dermatophytosis is a superficial fungal infection that affects humans and animals, which invades and multiplies in keratinized skin structures (skin, hair and nails)¹. It is considered the most common fungal infection in small animals such as dogs and cats and the most common pathogens belong to the genera *Microsporum* and *Trichophyton*. It is a significant skin disease, because it is contagious, infectious and can be transmitted to humans, especially pregnant women, young children, the elderly and immune-compromised individuals^{2,3}.

The main antifungals used in the treatment of dermatophytosis in both humans and animals are terbinafine, itraconazole and miconazole^{3,4,5,6,7}. Topical therapy aims to reduce the infectious, contagious and zoonotic risks associated with this disease, by disinfecting the hair and minimizing environmental contamination. However, when we approach veterinary dermatophytosis, the commonly used antifungals are not considered an option for use in monotherapy, since they need to be used in association with other medications, such as chlorhexidine or a systemic drug, to be effective treatment⁸. Systemic antifungal therapy, on the other hand, targets the active site of the infection and fungal proliferation in the infected animal. Itraconazole and terbinafine are the most effective and safe treatments for dermatophytosis and are an important therapeutic option when used in combination with topical treatment^{8,9}.

The current scenario of failures in antifungal therapy requires that new therapeutic alternatives be adopted to combat the resistance and recurrence of these fungal infections. For example, combined treatments and reintroducing known drugs⁹. The use of triple combination therapy has become an important strategy in combating several diseases, ensuring efficacy, safety and adherence to the treatment. Research has been conducted on its use, with satisfactory results in different areas such as bacterial infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*^{10,11} and hypertension^{12,13}. However, a triple combination is still not widely used in the area of fungal infections.

Clioquinol is a 5,7-dihalogenated derivative of 8-hydroxyquinoline and was used between the years 1950 and 1970 as a systemic and topical antiparasitic agent for the treatment of skin diseases. In the 70s, cases of neurotoxicity were reported from oral formulation use and, therefore, this form was withdrawn from the market. However,

clioquinol continued to be used as a topical antibiotic¹⁴.

Current studies from our research group show the efficacy of clioquinol against *Candida* spp. and dermatophytes, along with rare reports of resistance to it^{15,16}. Besides that, we also found promising results in *in vitro* experiments when combining clioquinol with ciclopirox and terbinafine to counter dermatophyte fungi. The low toxicity of these combinations in human leukocytes is also a beneficial factor and deserves to be highlighted¹⁷.

In this context, the aim of this research is to conduct studies of the antidermatophytic activity and the irritation potential from the double and triple combinations of clioquinol, terbinafine and ciclopirox (clioquinol + terbinafine; clioquinol + ciclopirox; clioquinol + ciclopirox + terbinafine) in *ex vivo* and *in vivo* alternative models.

2. Material and methods

2.1. Fungal isolates

Trichophyton rubrum and *Microsporum canis* isolates were included in this study. All strains were deposited in the Mycology Collection of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil) and originated from nail and skin scrapes from the National Program of Quality Control of Brazil.

2.2. Antifungal compounds

The drugs for this study were prepared according to CLSI recommendations¹⁸. The stock solutions for clioquinol (Sigma-Aldrich, USA), ciclopirox and terbinafine were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich). For the experiments, the compounds were prepared in combination and they were diluted in a RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) to a maximum concentration of 1% DMSO. The choice of combinations was based on previous studies¹⁷. Thus, the combinations tested were: clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) (A); clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.500 µg/mL) (B); and clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) (C).

2.3. Hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HET-CAM)

To evaluate the irritant potential of antifungal combinations, the alternative

HET-CAM (chicken egg test chorioallantoic membrane) method was used. The method was previously described by Oliveira et al. (2012)¹⁹ and is based on macroscopic changes to the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. For the evaluation, fresh fertile white Lohmann eggs (Lohmann selected Leghorn, LSL) were used. The eggs were kept under optimal incubation conditions (temperature 38 - 39°C and humidity 55 - 60% for 10 days). On the 10th day, the egg shell, around the airspace, was carefully removed with a rotary tool (Dremel, WI). Next, 0.3 ml of each substance was added to each egg; respectively: negative control - 0.9% saline solution, positive control - 0.1 M NaOH solution, double combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL), double combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL); and the triple combination of clioquinol (0.125 µg/ml) + ciclopirox (0.250 µg/ml) + terbinafine (0.03125 µg/ml). At predetermined times (30 seconds, 2 minutes and 5 minutes) after the application of each substance, the chorioallantoic membrane was examined and the observed physiological reactions were graded according to the time of their appearance. The result of the irritation index (II) was determined according to bleeding time, lysis time and clotting time and classified as non-irritating (0 to 4.9) or irritating (5 to 21), according to equation 1²⁰.

$$IS = \left(\left(\frac{(301 - Hemorrhage\ Time)}{300} \right) x 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - Lysis\ Time)}{300} \right) x 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - Coagulation\ Time)}{300} \right) x 9 \right) \quad (1)$$

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, as well as Dunnett's multiple comparison test (GraphPad Prism software; version 6.0;). P <0.05 was considered statistically significant.

2.4. Histopathological evaluation of pig ears

The pig ears underwent a histopathological evaluation, to assess the possible tissue damage from the action of the antifungal associations. Tissue samples from adult male pigs, recently slaughtered at the Federal Institute of Santa Catarina - Concórdia campus, were used to evaluate the damage to tissues, as a result of the action of the various combinations of clioquinol, ciclopirox and terbinafine. Pigs were slaughtered in accordance with the rules of the Ministry of Agriculture, with respect for

the welfare of the animals²¹. The pig's ear skin was used in this study. The tissues were removed within 5 minutes of slaughter. The hair was carefully removed by an electric trimmer and the skin transported to the laboratory in a cooled Krebs-Hepes buffer. The skin samples were mounted in Franz diffusion cells (Logan Instrument Corp., NJ) with a diffusion area of approximately 1.75 cm². The epidermal side of the skin was exposed to a phosphate buffered saline solution (PBS) pH 7.0 (negative control) and a 0.1 M NaOH solution (positive control) for a period of 6 hours. The double combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL), the double combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL) and the triple combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) were used in this test. The epidermal side of the skin was subjected to contact extraction with this solution for a period of 6 hours. Samples of these tissues were collected, fixed in 10% neutral buffered formalin, processed normally and stained with hematoxylin and eosin (HE) (Laborclin, Brazil) and then examined under optical microscopy. The experiments were carried out in triplicate.

2.5. *Ex vivo* nail infection

2.5.1. Preparation of the formulation

Antifungal combinations (A, B and C) were, separately, added to a nail lacquer (nitrocellulose, toluene sulfonamide, ethyl acetate, butyl acetate, mamona oil, isopropyl alcohol and dimethicone) that was produced by Bonatto Ind. Ltda (Cachoeirinha, Brazil). This nail lacquer was also evaluated on its own (base control).

2.5.2. Porcine hooves

An *ex vivo* onychomycosis model, using porcine hooves, was prepared as described by Quatrain et al. (2019)²², to assess the antifungal efficacy of the various combinations (A, B and C). Porcine hooves were autoclaved for 15 min at a temperature of 121°C to facilitate the extraction of material. After extraction, flat disks were cut, to a diameter of 9.5 mm and an average thickness of 1 mm. Before starting the experiments, the discs were autoclaved to ensure the sterility of the material.

2.5.3. Nail Infections

Infection of the Hooves was carried out, in the manner previously described

by Quatrin et al. (2019)²², by their inoculation with 100 µL of a *T. rubrum* (TRU47) fungal suspension (10^5 CFU/mL) on an BDA plate and spread using a Drigalski spatula. The infection period was for 5 days at a temperature of 32°C. After infection, the discs were transferred to another plate containing SDA to begin treatment, where by three drops of the treatment were applied daily for 7 days. After the treatment period, each disc was transferred to a falcon tube containing 2 mL of saline, which was vortexed for 1 min and then placed in a sonicator for 20 min. A 20 µL aliquot of this suspension was inoculated on an SDA plate and spread using a Drigalski spatula at the end of the experiment. The plates were incubated for 3 days at a temperature of 32 ° C and then the colony forming units (CFU) were counted. The assay was performed in triplicate. The Negative control (without any fungal inoculum) and the Untreated control were also performed in parallel. Any evidence of a relapse was analyzed. The discs that underwent treatment were transferred to an SDA plate and incubated for a period of 7 days at 32°C, so that it was possible to verify whether fungal cells survived on the discs after treatments.

2.6. Ex vivo dog fur infection

An evaluation was conducted of the effectiveness of combinations of antifungals in protecting fur of veterinary origin (from dogs, akita breed) from fungal biofilm and removing it (Figure 5). The double combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL), the double combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL) and the triple combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) were used in these assays.

2.6.1. Evaluation of the inhibition of biofilm formation:

In order to assess the inhibition of biofilm formation, animal hairs (all of a standard length of 3 cm) were pretreated with combinations of antifungal agents for 15 minutes and then incubated for 5 days, in 4.5 mL of TSB with 0.5 µL of *M. canis* fungal inoculum (MCA29), resulting in a suspension of 10^7 cells/mL. Next, the hair was washed with water and placed in a falcon tube containing 5 mL of distilled water and, subsequently, vortexed for 1 minute and then sonicated for 20 minutes to remove the adhering fungal cells.

The experiments were carried out in triplicate. An untreated control,

containing only the fungal inoculum, was also processed. A 20 µl aliquot of the sonicated suspensions was placed on an SDA plate and spread using a Drigalski spatula. At the end of the incubation period, the colony-forming units (CFU) were counted.

2.6.2. Evaluation of biofilm eradication:

The eradication of biofilm as a result of applying the formulations was also evaluated. In order to do this, biofilm was formed on other batches of hairs, over 5 days, in 4.5 mL of TSB and 0.5 µL of *M. canis* fungal inoculum (MCA29), resulting in a suspension of 10^7 cells/mL. Next, the hair was washed with water and treated with the formulations for 15 minutes. The hairs were then washed with water and placed in a falcon tube containing 5mL of distilled water and, subsequently, vortexed for 1 minute and then sonicated for 20 minutes to remove adhering fungal cells.

The experiments were performed in triplicate. An untreated control, containing only the fungal inoculum, was also processed. A 20 µl aliquot of the sonicated suspensions was placed on an SDA plate and spread using a Drigalski spatula. At the end of the incubation period, the colony-forming units (CFU) were counted. The percentage of biofilm inhibition and eradication was calculated according to equation 2:

$$\text{Inhibition or Eradication (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{CFU treatment} \times 100\%}{\text{CFU control}} \right) \quad 2)$$

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, as well as the Tukey multiple comparison test (Minitab® software; version 19.2). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

The HET- CAM results showed that the irritation index for the combination of clioquinol (0.125µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) was 3.17; for the combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL) it was 2.83; and for the combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) it was 3.41. All combinations showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) when compared to the positive control (irritation index = 19.81). Since all combinations had

an irritation index below 5, they were classified as non-irritant according to the methodology used. The physiological reactions in the chorioallantoic membrane when subjected to the combinations and controls can be seen in figure 1. In addition, the results of the histopathological assessment of the skin of the pig's ear incubated with the double combinations of clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) and clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL) and with the triple combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) did not show any microscopic lesions, as shown in Figure 2.

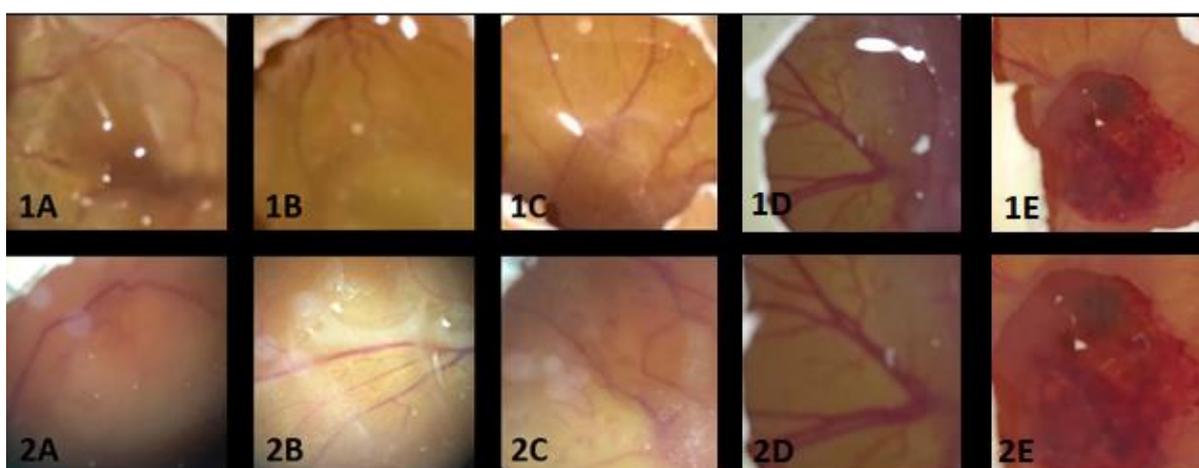


Figure 1. Observation of the physiological reactions in the chorioallantoic membrane when subjected to combinations of antifungal agents and controls, according to the HET-CAM methodology.

- 1A.** Combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL);
2A. Combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) with 20x magnification;
1B. Combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL);
2B. Combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL) with 20x magnification;
1C. Combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL);
2C. Combination of clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) with 20x magnification;
1D. Negative control (0.9% saline);
2D. Negative control (0.9% saline) with 20x magnification;
1E. Positive control (0.1M NaOH);
2E. Positive control (0.1M NaOH) with 20x magnification.

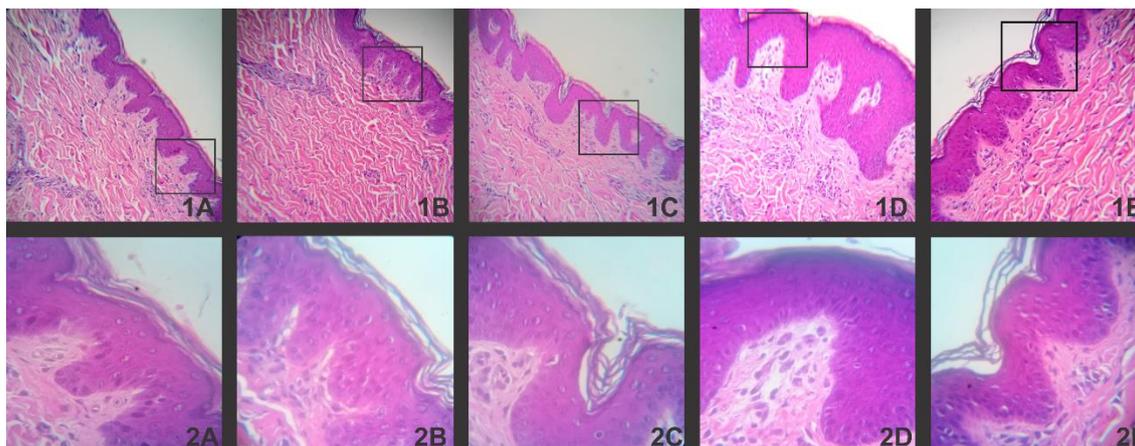


Figure 2. Histopathological evaluation of pig ear epidermal cells treated with combinations of antifungal agents and controls with 100 and 400 times magnification.

1A. Combination of clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafine (0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with 100 times magnification;

2A. Combination of clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafine (0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with 400 times magnification;

1B. Combination of clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with 100 times magnification;

2B. Combination of clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with 400 times magnification;

1C. Combination of clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafine (0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with 100 times magnification;

2C. Combination of clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafine (0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with 400 times magnification;

1D. Negative control (PBS pH 7.0) with 100 times magnification;

2D. Negative control (PBS pH 7.0) with 400 times magnification;

1E. Positive control (0.1M NaOH) with 100 times magnification;

2E. Positive control (0.1M NaOH) with 400 times magnification.

When analyzing the results from the effects of the combinations of antifungal agents on pigs' hooves, it should be noted that both the double combinations and the triple combination showed significant differences, compared to the untreated control (Figure 3). Although there was no significant difference between the treatments analyzed, only the double combinations managed to remove 100% of the CFU formed on the pig's hooves.

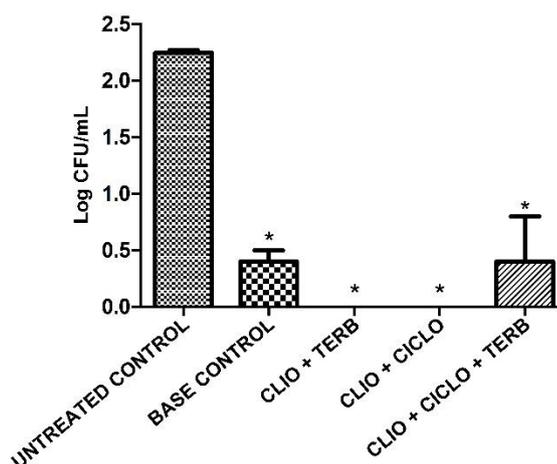


Figure 3. Count of colony forming units (CFU/mL), after the pigs' hooves were treated with the nail enamel base and with the addition of combinations of antifungal agents [clioquinol (CLIO), terbinafine (TERB) and ciclopirox (CICLO)], in the following combinations: clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafine (0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the triple combination of clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafine (0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Asterisks indicate a statistical difference compared to the untreated control (* $p < 0.05$).

When considering the effect of the various combinations on veterinary hair, it can be seen that biofilm formation was more effectively inhibited when using the clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) combination (Figure 4). On the other hand, the clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafine (0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) combination and the triple combination of clioquinol (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + ciclopirox (0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + terbinafine (0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were more effective in eradicating preformed biofilm, removing almost 100% of the cells.

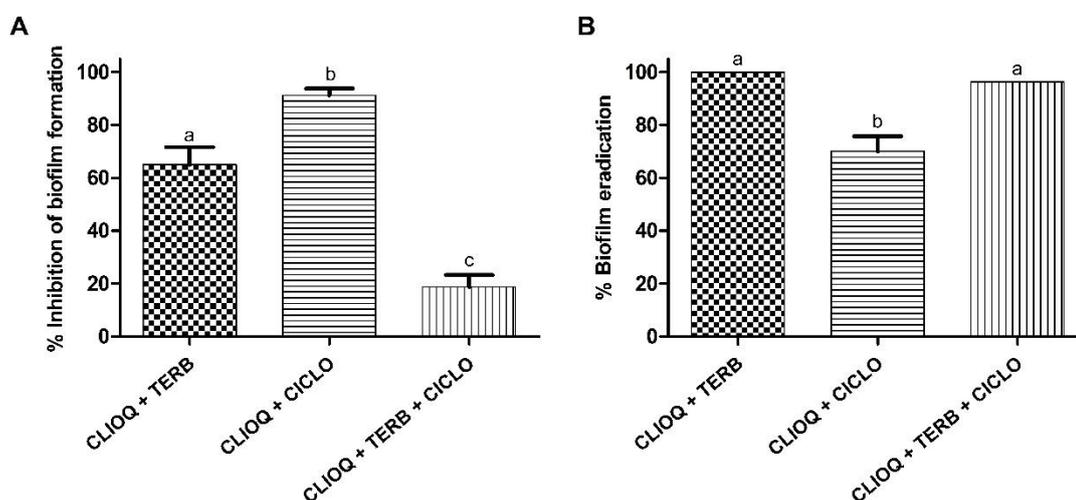


Figure 4. The evaluation of the protection provided from and the success in removing fungal biofilm

by antifungal combinations: clioquinol (0.125 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL), clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.5 µg/mL) and clioquinol (0.125 µg/mL) + ciclopirox (0.250 µg/mL) + terbinafine (0.03125 µg/mL) on fur of veterinary origin. (A) Percentage of biofilm formation inhibited by using combinations of antifungal agents. (B) Percentage of eradication of preformed biofilm by using combinations of antifungal agents. Different letters show a statistically significant difference ($p < 0.05$).

Clioquinol (CLIO), terbinafine (TERB) and ciclopirox (CICLO)

4. Discussion

The use of *ex vivo* tissues in an artificial environment can establish favorable conditions for the development of an infectious condition, partially preserving the tissue structure and the different cell types present. In this way, *ex vivo* models have become an attractive option in the development trials of new antifungal formulations, with the advantage of not needing the approval of an ethics committee^{23,24}.

From analysis of the results of the onychomycosis model, we can see that the double combinations (clioquinol + terbinafine and clioquinol + ciclopirox) proved to be a good therapeutic option, since they managed to inhibit 100% of fungal growth. In addition, there was no evidence of any growth when analyzing recurrence. Previous studies have shown that the complete eradication of onychomycosis using 8% ciclopirox enamel only occurs in a few cases (around 8.5%) and after more than 48 weeks of treatment²⁵. Santos and Hamdan (2006)²⁶ demonstrated that the use of the combinations of ciclopirox + ketoconazole and ciclopirox + itraconazole are more efficient than monotherapy. In addition, previous studies have also shown that the use of amorolfine in combination with terbinafine produces satisfactory results for the treatment of onychomycosis, and is an appropriate strategy for such an infection^{27,28}. The advantage of using a combined therapy, with both an oral and topical format concomitantly to treat onychomycosis, such as clioquinol + terbinafine, is that antifungal agents are able to penetrate the nail through two distinct regions: the oral ones reach the fungal pathogen through the nail bed (bottom of the nails), while the threads are absorbed through the keratin on the nail surface and in this way, the treatment has a complementary effect²⁸.

Dermatophytosis treatment in dogs involves a shampoo containing ketoconazole or miconazole. Research has already shown that the use of these

antifungal agents alone is not efficient. They have to be used in association with another component, such as chlorhexidine, to improve the activity²⁹. There are formulations available on the market that use chlorhexidine, however, this is a broad-spectrum antimicrobial and not very suitable for the treatment of dermatophytosis, since its main use is antibacterial³⁰. However, some studies have proven the synergistic effect of using chlorhexidine with miconazole and ketoconazole for dermatophytes^{8,31}. In addition, although the topical form of terbinafine is rarely studied^{8,32}, there are reports that have demonstrated the effectiveness of veterinary shampoo containing terbinafine hydrochloride in association with chlorhexidine gluconate in dogs with dermatophytosis³², showing that the complementary use of antimicrobials can be an important therapeutic option for treating these animals.

Our study demonstrated satisfactory results when antimicrobials are used in combination to treat or prevent dermatophytoses on the hair of domestic animals. To date, no similar study using ciclopirox and clioquinol has been reported in the literature. In this study, the combination of clioquinol + ciclopirox proved to be effective in inhibiting the formation of biofilm in veterinary hair, and may, in the future, be a successful therapeutic option for preventing infections by dermatophytes. This research, therefore, identifies an area to be further explored, as the results are encouraging and the effect of clioquinol in combination with antifungal drugs is an unprecedented finding.

The low toxicity results from the combinations used in the histopathological evaluation are highly satisfactory and corroborate the low irritation found in the chorio-allantoic membrane. These properties are important characteristics when it comes to developing and assessing new therapy options for the treatment of dermatophytoses, since topical therapy is the most commonly used in these cases, and the formulation can remain in contact with the skin for a prolonged period³³.

When used topically in normal concentrations, clioquinol can produce skin irritation, itching, erythema, swelling or pain^{34,35,36,37}. Foti et al. (2001)³⁸ reported a case of contact dermatitis when ciclopirox was used in normal doses, a drug widely used topically. Likewise, Bhari et al. (2017)³⁹ reported a case of allergic dermatitis when using terbinafine. However, these findings are considered rare. When combining clioquinol with other antifungal agents, the concentrations used are lower and, thus, the toxicity of the compounds can be reduced. However, in vivo tests are still needed, in order to analyze the antifungal effect of the associated drugs, as well as the

toxicological responses.

These findings are extremely relevant since the formulations available on the market for the treatment of dermatophytoses are not very effective. In addition, the results of this work are of interest to the veterinary area, since there is no formulation for topical use with clioquinol in its composition, only the presentation for human use that could be used in animals. Therefore, the use of clioquinol is a therapy option for formulations in this field.

5. Conflicts of interest

No conflict of interest declared.

6. Acknowledgment

To CONIF and SETEC for financial support.

7. References

1. Tartor, Yasmine H., Marwa E. Abo Hashem, and Shymaa Enany. 2019. "Towards a Rapid Identification and a Novel Proteomic Analysis for Dermatophytes from Human and Animal Dermatophytosis." *Mycoses* 62(12): 1116–26.
2. da Cunha, Michele Milano et al. 2019. "Epidemiological Investigation and Molecular Typing of Dermatophytosis Caused by *Microsporum Canis* in Dogs and Cats." *Preventive Veterinary Medicine* 167(March): 39–45.
3. Moriello, Karen A., Kimberly Coyner, Susan Paterson, and Bernard Mignon. 2017. "Diagnosis and Treatment of Dermatophytosis in Dogs and Cats.: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology." *Veterinary Dermatology* 28(3): 266–68.
4. Chermette, René, Laerte Ferreira, and Jacques Guillot. 2008. "Dermatophytoses in Animals." *Mycopathologia* 166(5–6): 385–405.
5. Dalla Lana, Aline Jacobi et al. 2018. "In Vitro Additive Effect on Griseofulvin and Terbinafine Combinations against Multidrug-Resistant Dermatophytes." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 54(2).
6. Pires, Carla Andréa Avelar et al. 2014. "Clinical, Epidemiological, and Therapeutic Profile of Dermatophytosis." *Anais Brasileiros de Dermatologia*

- 89(2): 259–64.
7. White, Theodore C. et al. 2014. “Fungi on the Skin: Dermatophytes and Malassezia.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4(8).
 8. Moriello, Karen A. 2017. “In Vitro Efficacy of Shampoos Containing Miconazole, Ketoconazole, Climbazole or Accelerated Hydrogen Peroxide against *Microsporum Canis* and *Trichophyton* Species.” *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19(4): 370–74.
 9. Fuentefria, A. M. et al. 2018. “Antifungals Discovery: An Insight into New Strategies to Combat Antifungal Resistance.” *Letters in Applied Microbiology* 66(1): 2–13.
 10. Jacobs DM, Safir MC, Huang D, Minhaj F, Parker A, Rao GG. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(1):76. Published 2017
 11. Tsala M, Vourli S, Georgiou PC, et al. Triple combination of meropenem, colistin and tigecycline was bactericidal in a dynamic model despite mere additive interactions in checkerboard assays against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(2):387-394.
 12. Düsing R, Waeber B, Destro M, Santos Maia C, Brunel P. Triple-combination therapy in the treatment of hypertension: a review of the evidence. *J Hum Hypertens.* 2017;31(8):501-510.
 13. Coghlan JG, Channick R, Chin K, et al. Targeting the Prostacyclin Pathway with Selexipag in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension Receiving Double Combination Therapy: Insights from the Randomized Controlled GRIPHON Study. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2018;18(1):37-47.
 14. Mao, Xinliang, and Aaron D. Schimmer. 2008. “The Toxicology of Clioquinol.” *Toxicology Letters* 182(1–3): 1–6.
 15. Pippi, Bruna et al. 2018. “New Insights into the Mechanism of Antifungal Action of 8-Hydroxyquinolines.” *Saudi Pharmaceutical Journal*: 4–11.
 16. Pippi, Bruna et al. 2017. “Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design.” *Medical Mycology* 55(7): 763–73.
 17. da Costa, B, Pippi, B, Andrzejewski Kaminski, TF, Andrade, SF, Fuentefria, AM. *In vitro* antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. *Mycoses.* 2020; 00: 1– 9.

18. 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.
19. Oliveira, Amanda Gleyce de Lima et al. 2012. "Chorioallantoic Membrane Assays (HET-CAM and CAM-TBS): Alternative Tests for Performing Toxicological Evaluation of Products with Low Potential for Ocular Irritation." *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 71(1): 153–59.
20. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVMA). *The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method*. Research Triangle Park: National Toxicology Program, 2010.
21. Brasil. Ministerio da agricultura. *Instrução Normativa nº 3/2000. Aprova Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para Abate Humanitário de Animais de Açougue*, 2013.
22. Quatrin PM, Kaminski TFA, Berlitz SJ, Guerreiro ICK, Canto RFS, Fuentefria AM. *Ex vivo* nail infection as an effective preclinical method for screening of new topical antifungals. *J Mycol Med*. 2020;30(2):100938.
23. Lossi, Laura, and Adalberto Merighi. 2018. "The Use of *Ex vivo* Rodent Platforms in Neuroscience Translational Research With Attention to the 3Rs Philosophy." *Frontiers in Veterinary Science* 5: 1–14.
24. Rosso, James Q D E L. 2014. "Onychomycosis and the Emergence of Newer Agents." *Clinical Aesthetic* 7(7): 10–18.
25. Lipner, S. R. 2019. "Pharmacotherapy for Onychomycosis New and Emerging Treatments..Pdf." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20(6): 725–35.
26. Santos, Daniel A., and J. S. Hamdan. 2006. "In Vitro Antifungal Oral Drug and Drug-Combination Activity against Onychomycosis Causative Dermatophytes." *Medical Mycology* 44(4): 357–62.
27. Baran, R. et al. 2007. "A Multicentre, Randomized, Controlled Study of the Efficacy, Safety and Cost-Effectiveness of a Combination Therapy with Amorolfine Nail Lacquer and Oral Terbinafine Compared with Oral Terbinafine Alone for the Treatment of Onychomycosis with Matrix Invol." *British Journal of Dermatology* 157(1): 149–57.

28. Evans, E. 2003. "Drug Synergies and the Potential for Combination Therapy in Onychomycosis." *British Journal of Dermatology* 149(65): 11–13.
29. Perrins, N., and R. Bond. 2003. "Synergistic Inhibition of the Growth in Vitro of *Microsporum Canis* by Miconazole and Chlorhexidine." *Veterinary Dermatology* 14(2): 99–102.
30. Mueller, Ralf S., Kerstin Bergvall, Emmanuel Bensignor, and Ross Bond. 2012. "A Review of Topical Therapy for Skin Infections with Bacteria and Yeast." *Veterinary Dermatology* 23(4).
31. Moriello, Karen A., and Maria Verbrugge. 2007. "Use of Isolated Infected Spores to Determine the Sporocidal Efficacy of Two Commercial Antifungal Rinses against *Microsporum Canis*." *Veterinary Dermatology* 18(1): 55–58.
32. Nam, Hyo-Seung, Tae-Young Kim, Suk-Hee Han, and Changbaig. Hyun. 2013. "Evaluation of Therapeutic Efficacy of Medical Shampoo Containing Terbinafine Hydrochloride and Chlorhexidine in Dogs with Dermatophytosis Complicated with Bacterial Infection." *Journal of Biomedical Research* 14: 154–59.
33. Gupta, M., U. Agrawal, and S. P. Vyas. 2012. "Nanocarrier-Based Topical Drug Delivery for the Treatment of Skin Diseases." *Expert Opinion on Drug Delivery* 9(7): 783–804.
34. Beck, M. H., and S. M. Wilkinson. 1994. "A Distinctive Irritant Contact Reaction to Vioform (Clioquinol)." *Contact Dermatitis* 31: 55.
35. Kero, M., M. Hannuksekla, and A. Sothman. 1979. "Primary Irritant Dermatitis from Topical Clioquinol." *Contact Dermatitis* 5: 115–17.
36. Morris, S D et al. 2002. "Contact Dermatitis and Allergy Comparative Frequency of Patch Test Reactions to Topical Antibiotics." *British Journal of Dermatology* 146: 1047–51.
37. Mussani, Farheen, David Poon, and Sandy Skotnicki-grant. 2013. "Systemic Contact Dermatitis to Topical Clioquinol / Hydrocortisone Combination Cream." *Dermatitits* 24(4): 196–97.
38. Foti, Caterina, Annalisa Diaferio, and Domenico Bonamonte. 2001. "Allergic Contact Dermatitis from Ciclopirox Olamine." *Australasian Journal of Dermatology* 42(2): 145.
39. Bhari, Neetu, Kanika Sahni, Tanvi Dev, and Vinod K. Sharma. 2017. "Symmetrical Drug-Related Intertriginous and Flexural Erythema (Baboon Syndrome) Induced by Simultaneous Exposure to Oral and Topical

Terbinafine.” *International Journal of Dermatology* 56(8): e168–70.