

PALOMA CRISTINA MALFETANO DA ROSA  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA AURANOFINA E DO  
IODOQUINOL CONTRA FUNGOS DA ORDEM MUCORALES



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
NOVEMBRO / 2024

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Eliana Barreto Bergter e coorientação da Dra. Mariana Ingrid D. S. Xisto.

**FICHA CATALOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

M248a Malfetano, Paloma  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA AURANOFINA  
E DO IODOQUINOL CONTRA FUNGOS DA ORDEM MUCORALES /  
Paloma Malfetano. -- Rio de Janeiro, 2024.  
74 f.

Orientadora: Eliana Barreto-Bergter.  
Coorientador: Mariana Xisto.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. Mucormicose. 2. Auranofina. 3. Iodoquinol. 4.  
antifúngicos. I. Barreto-Bergter, Eliana, orient.  
II. Xisto, Mariana, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNO(A): Paloma Cristina Malfetano da Rosa DRE: 120143617**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Antônio Ferreira Pereira (Presidente)  
 Prof. Dirlei Nico  
 Prof. Márcia Ribeiro Pinto da Silva  
 Prof. Daniela Sales Alviano (Suplente)

**Título da Monografia: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA AURANOFINA E DO IODOQUINOL CONTRA FUNGOS DA ORDEM MUCORALES"**

**Local: Sala de Seminários / IMPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 28 de novembro de 2024 às 09:00h**


Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 28 de novembro de 2024.

**NOTA:**

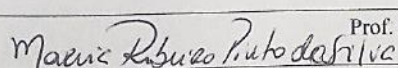
10,0

Banca Examinadora:

  
 Prof. Antônio Ferreira Pereira (Presidente)

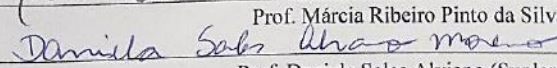
Prof. Dirlei Nico

10,0

  
 Prof. Márcia Ribeiro Pinto da Silva

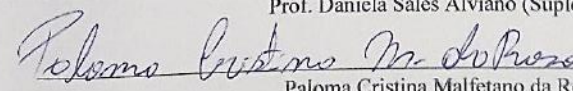
Prof. Márcia Ribeiro Pinto da Silva

10,0

  
 Prof. Daniela Sales Alviano (Suplente)

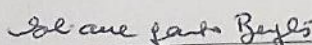
Prof. Daniela Sales Alviano (Suplente)

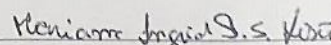
**Aluno(a):**

  
 Paloma Cristina Malfetano da Rosa

Paloma Cristina Malfetano da Rosa

**Orientador(a)**

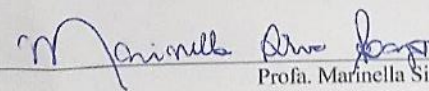




**(e coorientador):**

Prof. Eliana Barreto Bergter e Dr. Mariana Infrid D. S. Xisto

**Coordenadora de**



Profa. Marinella Silva Laport

**TCC:**

**"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."**

(Marie Curie)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração à Professora **Eliana Barreto Bergter** pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório. Sua confiança em meu trabalho foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e pessoal. À **Mariana Ingrid D. S. Xisto**, minha eterna gratidão pela paciência, pela orientação incansável e pelos ensinamentos que vou levar para a vida. O exemplo de competência e dedicação de ambas foi o que me inspirou a seguir este caminho acadêmico.

A todos os integrantes do Laboratório de Química Biológica de Microrganismos, **Andrêina, Caroline, Evely, Giulia, Johnatha, Julia, Nicole, Mariana C., Rodrigo, Yuri e Victor**, sou muito grato pelos momentos de aprendizado, pela troca de ideias e pela amizade que se construiu ao longo dessa jornada. Cada um de vocês fez essa experiência ainda mais especial e significativa.

aos meus amigos de longa data **Carlos Dias, Everton, Fabíola, Francisco, José, Natanael e Vitória** pelos mais de 11 anos de amizade, risadas, apoio e pelas conversas que sempre me ajudaram a manter o foco e a perspectiva. A **Ana** e o **Carlos Eduardo** pela parceria em todos os trabalhos e pela companhia constante durante a graduação.

Minha gratidão é imensa à minha mãe **Sandra** (*in memoriam*), meu pai **Roberto** e meu irmão **Roberto Jr.**, que sempre foram meu alicerce, me incentivando a seguir em frente e acreditando em mim, mesmo nos momentos mais difíceis. Sem o apoio de vocês, nada disso seria possível.

Aos professores **Antônio Ferreira Pereira, Dirlei Nico, Marcia Ribeiro Pinto da Silva e Daniela Sales Alviano Moreno**, agradeço por terem aceitado fazer parte da minha banca e por suas contribuições tão valiosas ao meu trabalho.

E, por fim, agradeço às agências de fomento **UFRJ, CNPq, FAPERJ, CAPES e INCT FUNVIR** pelo suporte financeiro que permitiu que eu pudesse realizar esse trabalho com dedicação e seriedade.

**RESUMO****PALOMA CRISTINA Malfetano da Rosa****AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA AURANOFINA E DO IODOQUINOL CONTRA FUNGOS DA ORDEM MUCORALES**

Orientadores: Eliana Barreto Bergter e Mariana Ingrid D. S. Xisto.

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

**Palavras-chave:** Mucormicose, Auranofina, Iodoquinol, antifúngicos

Mucormicose é o termo clínico utilizado para definir infecções ocasionadas por fungos da ordem Mucorales. São caracterizadas por serem oportunistas, as quais acometem pacientes imunocomprometidos e pacientes com doenças subjacentes. No entanto, também podem acometer pacientes imunocompetentes através de traumas ou queimaduras. O tratamento é desafiador e baseia-se em desbridamento cirúrgico combinado com antifúngico. No entanto, o arsenal terapêutico antifúngico atual não é satisfatório, sobretudo no perfil de resistência das espécies e dos problemas relacionados à toxicidade dos agentes antifúngicos utilizados na prática clínica. Portanto, é de extrema importância novas abordagens terapêuticas. O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial efeito antifúngico da auranofina e iodoquinol nas espécies de *Rhizopus oryzae*, *Mucor velutinosus* e *Cunninghamella* sp. A concentração inibitória mínima (MIC), determinada pelo método de microdiluição em caldo segundo EUCAST, foi considerada a menor concentração capaz de inibir 50% e 70% do crescimento e da viabilidade dos fungos testados. O MIC ficou entre 10-20 $\mu$ M. A auranofina e o iodoquinol foram capazes de reduzir o crescimento das três espécies testadas. Ambos os fármacos foram ativos contra o biofilme pré formado. Também foram testados o efeito dos fármacos na presença de estressores de membrana plasmática, osmótico e oxidativo, com o intuito de observar possíveis alvos da célula fúngica. A auranofina e o iodoquinol foram capazes de aumentar a susceptibilidade ao SDS e ao NaCl das espécies de *R. oryzae* e *M. velutinosus*. Apenas a auranofina aumentou a susceptibilidade das três espécies à menadiona, enquanto o iodoquinol aumentou a susceptibilidade à menadiona apenas de *R. oryzae*. Para analisar parâmetros celulares, foram

utilizados marcadores fluorescentes como concanavalina A, a qual detecta unidades de manose, calcofluor detecta quitina e Nile Red detecta lipídeos neutros. A auranofina e iodoquinol foram capazes de reduzir o conteúdo de lipídios neutros de *R. oryzae* e iodoquinol foi capaz de reduzir o conteúdo de quitina de *M. velutinosus*. A auranofina foi capaz de reduzir unidades de manose apenas da *Cunninghamella* sp. Um potencial efeito sinérgico foi analisado através do método de independência Bliss utilizando a espécie de *R. oryzae* como espécie representante. O efeito combinatório foi avaliado através da Concentração Inibitória Fracionada (FICI). A auranofina apresentou efeito aditivo combinado com o posaconazol, enquanto o iodoquinol apresentou efeito aditivo com o posaconazol. De acordo com o método de independência Bliss, auranofina apresentou sinergismo com o posaconazol, enquanto o iodoquinol somente apresentou sinergismo com a anfotericina B. Com base nos resultados podemos observar que a auranofina e o iodoquinol apresentam atividade antifúngica *in vitro* frente às espécies testadas.

## ABSTRACT

### PALOMA CRISTINA MALFETANO DA ROSA

Orientadores: Eliana Barreto Bergter e Mariana Ingrid D. S. Xisto.

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

**Key-words:** Mucormycosis, Iodoquinol, auranofin, antifungal,

Mucormycosis is the clinical term used to define infections caused by fungi from the Mucorales order. These infections are characterized by being opportunistic, affecting immunocompromised patients and those with underlying diseases. However, they can also affect immunocompetent patients through trauma or burns. Treatment is challenging and relies on surgical debridement combined with antifungal therapy. However, the current antifungal therapeutic arsenal is unsatisfactory, particularly due to the resistance profiles of the species involved and the toxicity issues associated with the antifungal agents used in clinical practice. Therefore, new therapeutic approaches are of utmost importance. The objective of this study was to evaluate the potential antifungal effects of auranofin and iodoquinol against *R. oryzae*, *M. velutinosus*, and *Cunninghamella* sp. The minimum inhibitory concentration (MIC), determined by the broth microdilution method according to EUCAST, was defined as the lowest concentration capable of inhibiting 50% and 70% of the growth and viability of the tested fungi. The MIC ranged from 10–20  $\mu$ M. Auranofin and iodoquinol were able to reduce the growth of all three tested species. Both drugs were active against pre-formed biofilms. The effect of the drugs in the presence of membrane stressors, osmotic stress, and oxidative stress was also tested to identify possible targets within the fungal cell. Auranofin and iodoquinol increased the susceptibility of *R. oryzae* and *M. velutinosus* to SDS and NaCl. Only auranofin increased the susceptibility of all three species to menadione, while iodoquinol increased the susceptibility to menadione only in *R. oryzae*. To analyze cellular parameters, fluorescent markers were used,

such as Concanavalin A to detect mannose units, Calcofluor to detect chitin, and Nile Red to detect neutral lipids. Auranofin and iodoquinol were able to reduce the neutral lipid content in *R. oryzae*, and iodoquinol reduced the chitin content in *M. velutinosus*. Auranofin reduced mannose units only in *Cunninghamella* sp. A potential synergistic effect was analyzed using the Bliss independence method, with *R. oryzae* as the representative species. The combinatory effect was evaluated using the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). Auranofin showed an additive effect when combined with posaconazole, while iodoquinol also showed an additive effect with posaconazole. According to the Bliss independence method, auranofin showed synergy with posaconazole, and iodoquinol showed synergy only with amphotericin B. Based on the results, we observed that both auranofin and iodoquinol exhibit *in vitro* antifungal activity against the tested species.

**RESUMO PARA LEIGOS**  
**PALOMA CRISTINA Malfetano da Rosa**

Orientadores: Eliana Barreto Bergter e Mariana Ingrid D. S. Xisto.

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

**Palavras-chave:** Antifúngico, fungos, medicamentos

A mucormicose, uma infecção fúngica grave causada por fungos pertencentes ao grupo Mucorales, tem se tornado uma preocupação crescente nos últimos anos principalmente em pacientes com comorbidades, além de apresentarem altas taxas de mortalidade. Embora seja mais comum entre pessoas com o sistema imunológico debilitado, a doença também pode afetar indivíduos saudáveis, especialmente em casos de lesões ou queimaduras. O tratamento para essas infecções é desafiador, devido a um diagnóstico tardio que resulta em uma infecção grave, além disso esses fungos demonstram uma alta resistência aos medicamentos antifúngicos atualmente disponíveis, tornando a busca por novas opções terapêuticas. O objetivo desse trabalho é avaliar o potencial efeito de dois fármacos (auranofina e iodoquinol) a fim de se tornarem medicamentos para o tratamento contra três espécies de fungos das espécies *Rhizopus oryzae*, *Mucor velutinosus* e *Cunninghamella sp.* Com base nos resultados presentes nesse trabalho a auranofina e iodoquinol demonstraram atividade antifúngica contra as três espécies que foram avaliadas.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Principais agentes da mucormicose.....	19
<b>Figura 2</b> – Estrutura do gênero <i>Rhizopus</i> .....	19
<b>Figura 3</b> – Formação do biofilme de fungos filamentosos.....	26
<b>Figura 4</b> – Mecanismo de ação da anfotericina B.....	29
<b>Figura 5</b> – Mecanismo de ação dos triazólicos.....	31
<b>Figura 6</b> – Estrutura química da Auranofina.....	36
<b>Figura 7</b> – Estrutura da 8-hidroxiquinolina.....	37
<b>Figura 8</b> – Estrutura química do Iodoquinol.....	38
<b>Figura 9</b> – Cinética de crescimento das espécies de <i>Mucorales</i> : <i>R. oryzae</i> , <i>M. velutinosus</i> , <i>Cunninghamella sp.</i> .....	46
<b>Figura 10</b> – Efeito da Auranofina no biofilme pré-formado de <i>R. oryzae</i> , <i>M. velutinosus</i> e <i>Cunninghamella sp.</i> .....	48
<b>Figura 11</b> – Alterações na organização do biofilme pré-formado causadas pela Auranofina.....	49
<b>Figura 12</b> – Efeito do Iodoquinol no biofilme pré-formado de <i>R. oryzae</i> , <i>M. velutinosus</i> e <i>Cunninghamella sp.</i> .....	51
<b>Figura 13</b> – Alterações na organização do biofilme pré-formado causadas pelo Iodoquinol.....	52
<b>Figura 14</b> – Susceptibilidade das espécies de <i>Mucorales</i> incubadas com Auranofina na ausência e presença dos estressores de membrana (SDS), oxidativo (NaCl) e osmótico (menadiona).....	53
<b>Figura 15</b> – Susceptibilidade das espécies de <i>Mucorales</i> incubadas com Iodoquinol na ausência e presença dos estressores de membrana (SDS), oxidativo (NaCl) e osmótico (menadiona).....	54
<b>Figura 16</b> – O efeito da Auranofina e Iodoquinol em células de <i>R. oryzae</i> , <i>M. velutinosus</i> e <i>Cunninghamella sp.</i> .....	56

**LISTA DE TABELA**

<b>Tabela 1</b> – Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Fungicida (MFC) contra <i>R. oryzae</i> , <i>M. velutinosus</i> e <i>Cunninghamella sp.</i> .....	46
<b>Tabela 2</b> – Efeito combinatório entre Auranofina e Iodoquinol com antifúngicos convencionais Anfotericina B e Posaconazol em espécies de <i>R. oryzae</i> .....	57
<b>Tabela 3</b> – Atividade antifúngica da Auranofina, Iodoquinol, Posaconazol e Anfotericina B – sozinhas ou em combinação, de acordo com o método de independência Bliss .....	57

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BDA** – do inglês, Ágar batata dextrose

**CAM** - COVID-19 associada à mucormicose

**GRP78** - Proteína 78 regulada por glicose

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**PBS** - Tampão Fosfato de Sódio

**TrxRs** - tioredoxina redutases

**MIC** - Concentração Mínima Inibitória

**XTT** - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

**SDS** - Dodecil Sulfato de Sódio

**MFC** - Concentração Mínima Fungicida

**EUCAST** - Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

**IL** – Interleucina

**TLR** – Receptor do tipo Toll, do inglês Toll-like receptor

**IFN- $\gamma$**  - Interferon-gama

**ROS** - espécies reativas de oxigênio

**FDA** - Administração de Alimentos e Medicamentos

**$\mu$ M** – Micromolar

**rpm** – Rotações por minuto

**$\mu$ l** – Microlitros

**ml** – Mililitro

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	VI
RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	IX
RESUMO PARA LEIGOS.....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE TABELA.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
ÍNDICE.....	XVI
1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Taxonomia, morfologia e ecologia dos mucormicetos .....	17
1.2. Manifestações clínicas e epidemiologia das infecções por espécies de Mucorales. ....	18
1.3 Estruturas fúngicas: Membrana e Parede celular. ....	21
1.4. Fatores de virulência e evasão do sistema imune.....	23
1.5. Biofilme.....	25
1.6. Diagnóstico para o tratamento de mucormicose.....	26
1.7. Tratamento de infecções causadas por espécies de Mucorales. ....	27
1.8. Reposicionamento de fármacos, uma estratégia para aumentar o arsenal terapêutico antifúngico.....	32
1.9 Auranofina.....	34
1.10. Iodoquinol.....	36
2. JUSTIFICATIVA .....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo geral .....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1. Microrganismos em condições de cultivo. ....	40
4.2. Obtenção de esporos.....	40
4.3. Ensaio para a determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Mínima Fungicida. ....	40
4.4. Ensaio de cinética de crescimento fúngico.....	41
4.4. Ensaio de inibição do biofilme pré-formado. ....	41
4.5. Susceptibilidade aos estressores de membrana, osmótico e oxidativo.....	42

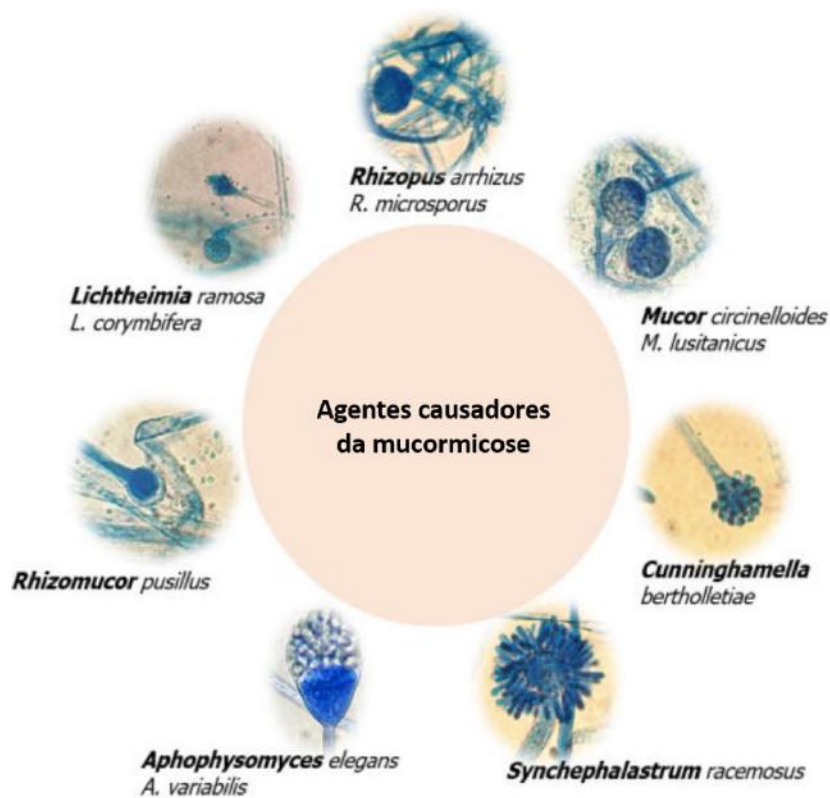
4.6. Método “checkerboard” para análise dos efeitos combinatórios entre os fármacos com agentes antifúngicos.....	43
4.7. Alterações nas células de <i>R. oryzae</i> , <i>M. velutinosus</i> e <i>Cunninghamella</i> sp. causadas pela Auranofina e o Iodoquinol.....	44
4.8. Análises estatísticas.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Ensaio para a determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Mínima Fungicida.....	45
5.2 Cinética de Crescimento.....	46
5.2 Ensaio de inibição do biofilme pré-formado.....	47
5.4. Susceptibilidade de <i>R. oryzae</i> , <i>M. velutinosus</i> e <i>Cunninghamella</i> sp. a estressores de membrana, osmótico e oxidativo na presença de auranofina ou iodoquinol.....	52
5.5. Alterações celulares de espécie de <i>R. oryzae</i> , <i>M. velutinosus</i> e <i>Cunninghamella</i> sp. causadas pela Auranofina e o Iodoquinol.....	54
5.3. Método “checkerboard” para análise dos efeitos combinatórios entre os fármacos com agentes antifúngicos.....	56
6. DISCUSSÃO.....	58
8. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS.....	67

## 1.INTRODUÇÃO

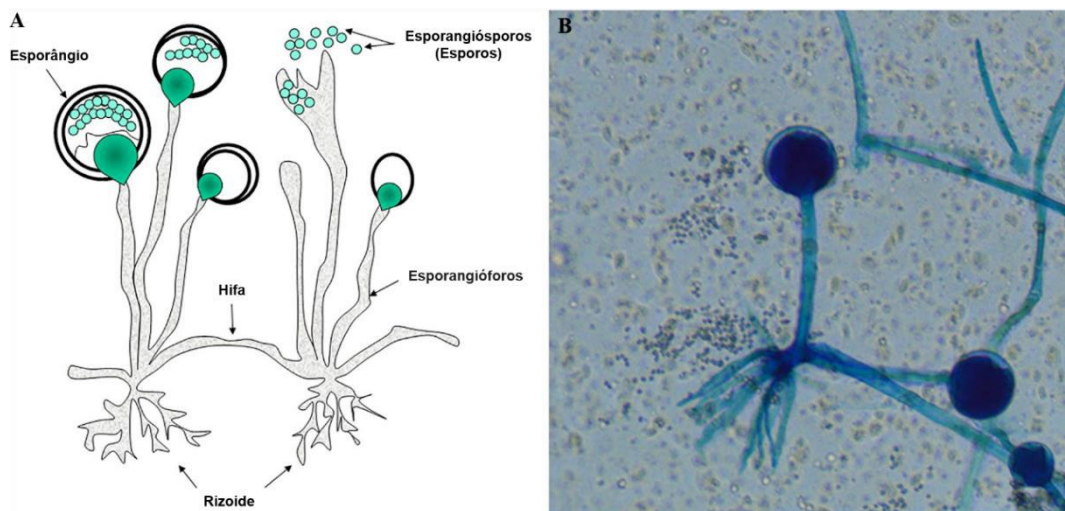
### 1.1. Taxonomia, morfologia e ecologia dos mucormicetos.

Os fungos da ordem Mucorales eram classificados anteriormente como pertencentes ao filo Zygomycota, caracterizado por fungos com hifas asseptadas hialinas e reprodução sexuada através da formação de zigosporos. Dentro deste filo, havia a classe Zigomicetos que era subdividida nas ordens Mucorales e Entomophthorales, ambos agentes causadores de infecções humanas (Ribes *et al.*, 2000). No entanto, com os avanços das técnicas moleculares e aplicações destas técnicas de análise genética ocorreu a reclassificação dessas ordens. Atualmente o filo Zygomycota foi dividido em dois filios, Mucoromycota e Zoopagomycota. O filo Mucoromycota possui o subfilo Mucoromycotina a qual inclui a ordem Mucorales. (Walther *et al.*, 2019).

Fungos da ordem Mucorales são caracterizados por serem cosmopolitas e ubiqüitários, já que estão presentes em todos os ambientes, principalmente no solo e matéria orgânica em decomposição. Além disso, são termotolerantes, sendo capazes de crescer à temperatura do corpo humano. A ampla distribuição ecológica, rápido crescimento e a termotolerância são fatores que contribuem para a sua capacidade de causar doenças em humanos (Binder, Maurer, e Lass-Flörl, 2014). Dentro desse grupo os gêneros que se destacam como causadores de infecção humana são *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Cunninghamella* spp., *Syncephalastrum* spp., *Aphophysomyces* spp., *Rhizomucor* spp., *Lichteimia* spp. (**Figura 1**). Microscopicamente, a sua morfologia assexuada apresenta hifas largas e irregulares com nenhuma ou rara septação (hifa cenocítica), corpo de frutificação esféricos fechados chamados de esporângios que englobam esporos assexuados unicelulares endógenos chamados de esporangiósoros. Quando o esporângio é rompido são liberados esporos para o ambiente extracelular, que eventualmente irão germinar originando as hifas (**Figura 2**) (Steinbrink e Miceli, 2021, Scheler e Binder, 2024).



**Figura 1:** Principais agentes da mucormicose (adaptado Scheler e Binder, 2024).



**Figura 2:** Estrutura do gênero *Rhizopus*. (A) Representação esquemática da estrutura fúngica. (B) Microscopia em campo claro (Adaptado Steinbrink e Miceli, 2021).

## 1.2. Manifestações clínicas e epidemiologia das infecções por espécies de Mucorales.

Mucormicose é o termo clínico utilizado para infecções causadas por fungos que pertencem à ordem Mucorales. Os gêneros mais prevalentes nas infecções são *Rhizopus*

spp., *Mucor* spp. e *Lichtheimia* spp. (anteriormente chamado de *Absidia*) (Katragkou Walsh e Roilides, 2014), sendo *Rhizopus oryzae* a espécie mais prevalente em isolados clínicos em cerca de 70% dos casos de infecção (Ibrahim *et al.*, 2012). Os fatores de risco que culminam na mucormicose são Diabetes Mellitus, tratamento com corticosteroides, neutropenia, altos níveis de ferro livre, doenças renais crônicas, neoplasia hematológicas, neonatos prematuros, desnutridos, uso ilícito de drogas intravenosas, traumas e queimaduras (Petrikkos *et al.*, 2012; Katragkou e Roilides, 2014; Panda *et al.*, 2024). Apesar de serem fungos oportunistas, os mucormicetos podem causar infecção em pacientes imunocompetentes através de lesões e queimaduras. As portas de entradas para infecção são diversas, podendo ocorrer através da inalação, ingestão de esporos e inoculação traumática, sendo a forma de transmissão mais predominante por inalação dos esporos (Baldin, e Ibrahim, 2017; Alqarihi, Kontoyiannis, e Ibrahim, 2023). A mucormicose possui uma variedade de manifestações clínicas podendo afetar diversos sítios anatômicos como regiões faciais, cérebro, camada subcutânea da pele, pulmões, estômago e intestino, além de afetar raramente áreas como coração, rins, peritônio e ossos (Petrikkos *et al.*, 2012; Dam *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2023).

Pacientes com Diabetes Mellitus constitui um grupo altamente suscetível à mucormicose, chegando a 33% dos casos de mucormicose associada à diabetes (Alqarihi, Kontoyiannis, e Ibrahim, 2023). Devido à deficiência dos pacientes em produzir insulina ocorre um aumento de açúcar no sangue que, além de enfraquecer o sistema imunológico, torna um ambiente favorável à mucormicose. Nos indivíduos com Diabetes Mellitus a inalação de esporos é a principal forma de infecção, culminando em mucormicose rino-orbital cerebral, uma infecção que envolve a região facial afetando nariz, seios paranasais e progredindo até o cérebro com consequentemente necrose nesses tecidos. Outras manifestações clínicas em pacientes diabéticos, como a mucormicose pulmonar, são raras de ocorrer (Khanna *et al.*, 2021; Sharma, e Goel, 2022).

Pacientes com doenças hematológicas são o segundo grupo mais suscetível à mucormicose. Assim como em pacientes diabéticos a inalação de esporos é a porta de entrada mais comum nestes indivíduos. A manifestação clínica predominante é a mucormicose pulmonar, apresentando sinais clínicos de tosse, dispneia, dor torácica e hemoptise (Bao *et al.*, 2022; Gupta *et al.*, 2023). Além disso, pacientes com doenças

hematológicas possuem um alto risco de disseminação da doença ocorrendo em 40% dos casos, geralmente iniciando no pulmão e alcançando outros tecidos (Eucker *et al.*, 2001; Pagano *et al.*, 2004). Como pacientes neutropênicos apresentam baixa quantidade de células fagocíticas e o sistema mucociliar debilitado torna-se um grupo suscetível a infecções por mucormicetos (Ibrahim *et al.*, 2012).

Em indivíduos imunocompetentes, os mucormicetos geralmente causam uma infecção na região subcutânea. Nestes indivíduos episódios de lesões traumáticas ou queimaduras são os principais fatores para a inoculação direta dos esporos. Não há sinais e sintomas no início da infecção, porém com o passar do tempo a infecção pode evoluir para um eritema no local da lesão, progredindo para uma pele enegrecida causada pela necrose (Venkatesh *et al.*, 2018). Episódios de infecção em indivíduos imunocompetentes podem ocorrer em áreas que sofreram algum desastre natural, situação de guerra ou em casos de acidente automobilístico (Beaver *et al.*, 2021; Benedict e Park 2014). Em 2011 um tornado atingiu a cidade de Joplin no Missouri levando a 13 casos de mucormicose cutânea em estado de necrose em pacientes imunocompetentes (Neblett *et al.*, 2011). Motivos que levam ao aumento de infecção subcutânea nessas condições ocorrem devido ao maior contato de matéria orgânica contaminada. Ademais ocorreram surtos de mucormicose associados a materiais hospitalares contaminados, como bandagens adesivas, abaixadores de língua e cateteres (Rammaert *et al.*, 2012).

Mucormicose é a terceira micose invasiva mais frequente, ficando atrás de aspergilose e candidíase e apresentando um alto taxa de mortalidade (Prakash *et al.*, 2019; Panda *et al.*, 2024). Durante as últimas décadas ocorreu um aumento na prevalência de mucormicose em todo o mundo, devido ao aumento de pacientes imunocomprometidos e pacientes com doenças subjacentes. A incidência da mucormicose é mundial, apresentando maiores prevalências em regiões tropicais e subtropicais principalmente no outono devido à maior dispersão de esporos e temperatura favorável para o crescimento fúngico (Prakash *et al.*, 2020, Panda *et al.*, 2024). Regiões como Europa, Ásia e América são as mais afetadas pela mucormicose com distribuição de 35%, 31% e 28% respectivamente (Gupta *et al.*, 2023).

Durante a pandemia da COVID-19, ocorreu um aumento de co-infecções com fungos causadores de aspergilose, candidíase e mucormicose em pacientes infectados

pelo vírus (Özbek *et al.*, 2023). A COVID-19 associada à mucormicose (CAM) foi prevalente em países como Índia, Irã e Turquia, e em 2021 foi decretada epidemia na Índia devido ao grande número de casos de mucormicose nessa região (Nagalli e Kikkeri, 2021; Pasquier, 2023). Casos de CAM também foram relatados em outros países como Brasil, Chile, França, Itália, México, Espanha, Áustria, Reino Unido e Estados Unidos (Riad *et al.*, 2021). O aumento de internação de pacientes com COVID-19 em Unidade de Tratamento Intensivo, culminou na dificuldade de atendimento às necessidades dos pacientes como a escassez de oxigênio e ventilação, além da dificuldade no controle das infecções, possibilitando a contaminação cruzada e aumento de infecções oportunistas em pacientes em ambiente hospitalar (Abd El-Baky *et al.*, 2023). Outros fatores que favoreceram o aumento de CAM foi o aumento de doenças subjacentes que levaram a utilização de corticosteróides e antibióticos de amplo espectro (Almyroudi *et al.*, 2022; Panda *et al.*, 2024).

O Brasil foi o país da América Latina com maior prevalência de mucormicose durante a pandemia e pacientes com diabetes, transplantes de órgãos e malignidade hematológica foram os mais afetados (Farias *et al.*, 2021). Em junho de 2021 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) notificou que os casos de candidemia, aspergilose invasiva e mucormicose associados à COVID-19 deveriam ser notificados pelos serviços de saúde (ANVISA, 2021). Nos anos de 2018 até 2022 foram notificadas pelo Ministério da Saúde ao todo 206 casos de mucormicose (Ministério da saúde, 2022).

### **1.3 Estruturas fúngicas: Membrana e Parede celular.**

A parede celular é uma estrutura dinâmica e essencial para a viabilidade, morfogênese e patogênese dos fungos (Gow, Latge, Munro, 2017). A parede celular não se limita somente em ser uma camada externa, mas também é uma estrutura dinâmica, que confere uma grande diversidade fenotípica e alta plasticidade, além de conferir proteção e regulação ao ambiente externo e a manutenção da integridade celular (Gow, Latge, Munro, 2017; Cortés *et al.*, 2019). Portanto, a ruptura da estrutura da parede celular tem grande impacto na sobrevivência das células fúngicas (Cortés *et al.*, 2019). Do ponto de vista da interação do patógeno fúngico e do hospedeiro, a parede celular estabelece um papel crucial, onde medeia o processo de adesão celular, além de conterem moléculas

fundamentais em induzir ou evitar a resposta imune no hospedeiro (Coronado *et al.*, 2007; Erwig e Gow, 2016; Gow *et al.*, 2017). Além disso, a ausência da parede celular fúngica em células humanas torna essa estrutura alvo ideal para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas, apresentando uma toxicidade seletiva e conseqüentemente baixa incidência de efeitos colaterais (Cortés *et al.*, 2019).

A parede celular fúngica é composta majoritariamente por polissacarídeos, e possui camadas distintas, onde a mais interna contém componentes relativamente conservados e a mais externa tem uma composição heterogênea e espécies-específica (Hatinguais, Willment, e Brown, 2020). A maioria dos fungos apresentam  $\beta$ -(1,3)-glucana,  $\beta$ -(1,6)- glucana ramificadas e quitina, em sua camada mais interna, os quais formam um exoesqueleto que resiste às pressões hidrostáticas internas da célula. O que difere as espécies fúngicas é majoritariamente moléculas da camada mais externa. Como por exemplo, as espécies do gênero *Scedosporium* e *Lomentospora* os quais apresentam moléculas como a peptidoramnomanas (PRM), glucosilceramidas,  $\alpha$ -glucanas e ramnomanas, essenciais para arquitetura dessa parede celular fúngica, além de apresentarem outros componentes como proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI), melanina e ecto-fosfatases (Barreto-Bergter *et al.*, 2011; Ghamrawi *et al.*, 2015; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2020). Já a parede de *Aspergillus fumigatus* é composta por  $\beta$ -(1,3)-glucana ligado a quitina, galactomanana,  $\beta$ -(1,3)-glucana,  $\beta$ -(1,4)-glucana e outros polissacarídeos incluindo  $\alpha$ -(1,3)-glucana e galactosaminogalactana (Latgé, Beauvais e Chamilos, 2017).

O conhecimento sobre a estrutura da parede celular das espécies de Mucorales é limitada em relação a outros patógenos fúngicos. O principal componente da parede celular dos mucormicetes é a quitina (polímero de *N*-acetil glucosamina), além da quitosana, um derivado deacetilado da quitina (Rinaudo, 2006). Para algumas espécies, já foi descrita a presença de um heteropolímero alcali-solúvel de ácido D-glucurônico, fucose, manose e galactose (mucoran), um polímero insolúvel do ácido D-glucurônico (Bartnicki-Garcia e Reyes, 1968; Zamani *et al.*, 2008 ) Além disso, a  $\beta$ -1,3-glucana, um polissacarídeo presente em diversas espécies fúngicas, não está presente na parede celular dos Mucorales, o que limita a utilização de medicamentos antifúngicos da classe das equinocandinas que tem apresentam como alvo está molécula (Denning, 2003; Pickering *et al.*, 2005).

Assim como a parede celular fúngica, a membrana plasmática desempenha um papel crítico na virulência de fungos patogênicos. De maneira geral a membrana plasmática é constituída por uma bicamada anfifílica compostas por lipídios de diversas classes e proteínas, sendo essencial para manter a integridade física e estrutural das células fúngicas (Peng e Chen, 2024). Diversos fármacos antifúngicos têm como alvo a membrana plasmática fúngica, o qual é estrutura vital para a sobrevivência. Ao interferir nas funções dessa membrana, os fármacos comprometem a integridade celular resultando na morte do fungo, sendo uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento de infecções fúngicas (Douglas e Konopka, 2016). Nos últimos anos descobriram que lipídios de membrana são reguladores importantes na patogenicidade fúngica, com funções de virulência e contribuem para o aumento da resistência aos principais medicamentos antifúngicos, formação de biofilme e liberação de vesículas extracelulares. Além de conferir funções estruturais e mecânicas como a formação de esfingolipídios e esteróis (Rella, Farnoud e Poeta, 2016).

#### **1.4. Fatores de virulência e evasão do sistema imune.**

Os fungos podem colonizar e invadir o organismo hospedeiro de diversas formas e dessa forma a barreira epitelial, o sistema mucociliar e as células do sistema imune são cruciais na resposta contra a invasão desses patógenos (Ghuman e Voel, 2017). A resposta imune inata é crucial para impedir o estabelecimento da infecção e propagação fúngica. O reconhecimento de moléculas presentes na parede celular fúngica é essencial para a ativação da resposta imune e desencadeamento de uma resposta inflamatória (Montaño e Voigt, 2020). Células mononucleares, macrófagos e neutrófilos são células de defesa essenciais contra a invasão de células fúngicas. Macrófagos teciduais são a primeira linha de defesa e tem a função de fagocitar os esporos de Mucorales sendo fundamentais para estimular a resposta adaptativa. Entretanto, esporos que escapam e germinam induzem a quimiotaxia dos neutrófilos que exibem efeitos citotóxicos (Lionakis Kontoyiannis, 2003; Roilides, Kontoyiannis, Walsh, 2012; Ghuman e Voelz, 2017). Além disso, esporos inchados e hifas são mais suscetíveis à ação de macrófagos e neutrófilos enquanto esporos em repouso são altamente resistentes a atividades dos macrófagos (Levitz *et al.*, 1986). Estudos demonstraram que os receptores do tipo Toll (TLR2) são determinantes para o reconhecimento de espécies de *R. oryzae* (Levitz *et al.*, 1986). O sistema imune

adaptativo desempenha papel secundário em infecções fúngicas invasivas. A secreção da citocina IL-17 por linfócitos Th17 induzem a produção de defensinas antifúngicas pelos neutrófilos, fortalecendo o ataque neutrofílico. Além disso, citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10 são produzidas durante a infecção e foi demonstrado que células T produtoras de IFN- $\gamma$  causam danos nas hifas de Mucorales (Ghuman e Voelz, 2017).

A angioinvasão é a principal maneira dos mucormicetos invadir o hospedeiro. A penetração do endotélio vascular leva à trombose e necrose do tecido, o que permite a disseminação hematogênica dos Mucorales (Liang *et al.*, 2024). Além disso, a região necrosada impede a chegada de leucócitos e agentes antifúngicos na região. Esporos de Mucorales invadem as células endoteliais através da proteína CotH a qual reveste os esporos e são encontradas exclusivamente em Mucorales além de ser um importante mecanismo de virulência. Essa proteína CotH se liga a Proteína Regulada por Glicose 78 (GRP78) no endotélio hospedeiro levando a endocitose do fungo (Liu *et al.*, 2010). A GRP78 é uma proteína da família HSP70 que fica localizado no retículo endoplasmático de células endoteliais (Liu *et al.*, 2010). No entanto, quando as células do hospedeiro passam por situações de estresse como hiperglicemia, acidose e excesso de ferro livre no sangue, elas aumentam a expressão do receptor GRP78 na superfície celular (Baldin e Ibrahim, 2017).

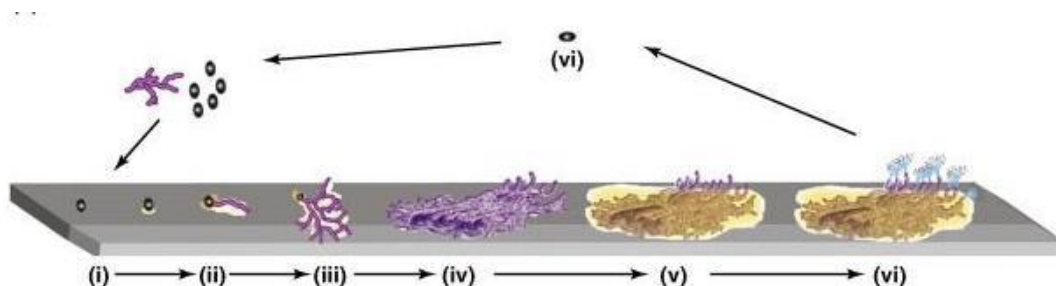
A aquisição de ferro livre do hospedeiro é um fator crucial para patogênese desses fungos. Já tem sido demonstrada a importância do ferro para o crescimento e desenvolvimento de patógenos microbianos (Ibrahim e Edwards, 2008). Hospedeiros mamíferos apresentam mecanismos de defesa eficazes para evitar que ocorram efeitos tóxicos causados pelo ferro livre e impedir que microrganismos colem seu ferro. Esse mecanismo utiliza proteínas transportadoras, tais como a transferrina, ferritina e lactoferrina, que se ligam ao ferro impedindo que o hospedeiro fique com ferro livre no sangue, limitando a aquisição de ferro por microrganismos (Ibrahim, Spellberg e Edwards, 2008; Ibrahim *et al.*, 2012). Em pacientes com hiperglicemia e acidose sanguínea a função das proteínas ferritina e transferrina em quelar o ferro estão alteradas, causando maior disponibilidade de ferro livre, favorecendo a mucormicose (Radotra e Challa, 2022). De maneira geral existem dois mecanismos principais que os Mucorales utilizam para adquirir o ferro do hospedeiro: a permease de ferro de alta afinidade ou

através de quelantes de ferro (sideróforos) (Ibrahim *et al.*, 2010). Ademais, os mucormicetos secretam moléculas que favorecem o processo de infecção como proteases e micotoxinas que causam danos celulares aos hospedeiros possibilitando o aumento da angioinvasão (Tanwar *et al.*, 2024).

### 1.5. Biofilme.

A maioria dos microrganismos, principalmente fungos, não são comumente encontrados na natureza como células planctônicas. Na verdade, são encontrados em uma comunidade polimicrobiana robusta, organizada e denominada biofilme (Harding *et al.*, 2009). Estima-se que 80% das infecções microbianas são ocasionadas por biofilme (Tits, Cammue e Thevissen, 2020). Essa estrutura confere inúmeras vantagens ao microrganismo, incluindo proteção contra o meio ambiente, resistência ao estresse físico e químico, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica (Ramage *et al.*, 2012). Além disso, o biofilme pode ser formado em diversas superfícies incluindo tecidos vivos, materiais hospitalares (Costa-Orlandi *et al.*, 2017).

De maneira geral a estrutura do biofilme de fungos filamentosos é formada primeiramente através da adesão primária das células a um substrato, podendo ser uma superfície biótica ou abiótica. Em seguida ocorre a fase de proliferação do biofilme. As hifas e a matriz extracelular são formadas à medida que o biofilme amadurece. Assim que o biofilme é formado ocorre a dispersão, na qual as esporos e/ou fragmentos de hifas presente na superfície são dispersados e colonizam a região ao redor iniciando um novo ciclo (**Figura 3**) (Harding *et al.*, 2009; Costa-Orlandi *et al.*, 2017).



**Figura 3:** Modelo de formação de biofilme por fungos filamentosos. O modelo considera as seguintes etapas: (i) adesão à superfície, (ii) fixação, (iii) formação da microcolônia I (germinação e/ou desenvolvimento de monocamada), (iv) formação da microcolônia. (Harding *et al.*, 2009).

É descrito na literatura que o biofilme fúngico confere diversas vantagens para a sua virulência. Diversos fungos clinicamente relevantes apresentam a capacidade de formar biofilme incluindo as espécies *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis* e *Rhizopus oryzae* (Singh *et al*, 2011; Fanning *et al*, 2012). Do ponto de vista clínico a formação de biofilme ocasionado por microrganismos patogênicos confere um grande risco à saúde pública, visto que essas comunidades apresentam características as quais favorecem um aumento da resistência aos antimicrobianos e maior tolerância ao sistema imunológico. Alterações na parede celular, maior densidade de matriz extracelular e maior efluxo de antifúngicos são fatores que aumentam a resistência aos antifúngicos em biofilmes, permitindo que essas estruturas consigam manter a sobrevivência mesmo em altas concentrações de antifúngicos (Íñigo e Del Pozo, 2018; Rather, Gupta, Mandal, 2021). Sítios de infecções fúngicas associadas a biofilme são comumente observadas na cavidade oral, pulmões (geralmente em pacientes entubados/ventilados), queimaduras e infecções ocasionadas por cateteres (Íñigo e Del Pozo, 2018).

### **1.6. Diagnóstico para o tratamento de mucormicose.**

O diagnóstico para mucormicose é desafiador. A análise rápida de sinais e sintomas específicos para mucormicose é essencial para um bom diagnóstico e consequentemente um tratamento eficaz. No entanto a suspeita da infecção é muitas vezes tardia culminando no aumento da taxa de mortalidade (Azhar *et al.*, 2022). A diplopia (visão dupla) em pacientes diabéticos ou a dor da pleurite em pacientes neutropênicos podem ser indicativos de mucormicose (Sharma e Goel, 2022). O diagnóstico da mucormicose é constituído pela detecção do patógeno através do uso de diversas abordagens, como exame microscópio direto, cultivo, análise histológica de biópsias, métodos moleculares e exames de imagens radiográficas (Cornely *et al.*, 2019). O diagnóstico dessas espécies é complexo devido a inespecificidade de sinais e sintomas no início da infecção, além da fisiopatologia, fatores de risco e o modo de entrada no hospedeiro são semelhantes a aspergilose e fusariose (Kontoyiannis e Lewis, 2011). Os elementos que auxiliam no diagnóstico de mucormicose em exames diretos ou histopatológicos são a observação de hifas irregulares e largas semelhantes a fitas e a

ausência ou a presença de poucos septos. A utilização de corantes como hematoxilina-eosina, ácido periódico-Schiff, Grocott-Gomori podem auxiliar a identificação da estrutura fúngica em cortes histológicos. A visualização de hifas de aspecto hialino em espécimes clínicos confirma a infecção fúngica, no entanto, não identifica gênero a que o isolado clínico pertence. A morfologia de espécies de Mucorales pode ser facilmente distinguível de outros gêneros fúngicos como *Aspergillus* e *Fusarium* quando cultivados em cultura, no entanto a falta de especialistas capacitados em identificar morfologias fúngicas dificulta a classificação morfológica dos espécimes clínicos (Skiada *et al.*, 2018; Sharma e Goel, 2022).

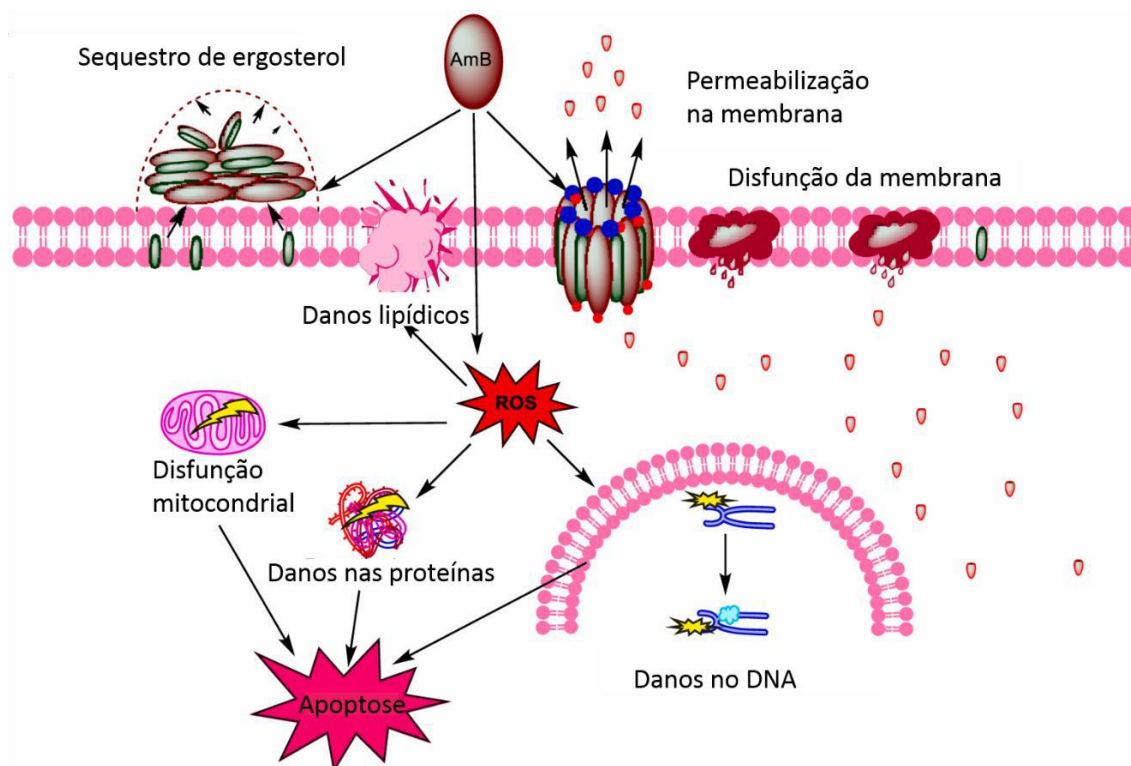
Kits comerciais como o ID32C (Bio Merieux, Marcy l'Étoile, France) e API 50CH (BioMerieux) são eficazes na identificação de algumas espécies como *Rhizomucor pusillus* e *Lichtheimia corymbifera*. No entanto, esses kits são ineficazes na identificação de espécies do Gênero *Mucor* (Ramani *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 2007; Ayushi, e Goel, 2022). A espectrometria de massas MALDI-TOF é uma técnica rápida e simples para identificação de espécies fúngicas. Na literatura, há trabalhos que relatam o uso bem-sucedido dessa tecnologia para análise de algumas espécies (Schrödl *et al.*, 2012; Someshwaran e Appalaraju, 2023). Diagnósticos moleculares são formas mais sensíveis de curto prazo para identificação de agentes patogênicos. A identificação de espécies de Mucorales está restrita a testes de detecção de DNA como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A utilização de PCR para diagnóstico trouxe resultados positivos, permitindo a confirmação de espécies de Mucorales. (Shadrivova, Burygina, e Klimkom, 2019; Lackner, Posch, e Lass-Flörl, 2021; Dannaoui, 2022).

### **1.7. Tratamento de infecções causadas por espécies de Mucorales.**

O manejo clínico para o tratamento da mucormicose é desafiador e agressivo, devido a capacidade desses fungos causarem angioinvasão e necrose nos tecidos. Para a maioria dos pacientes ocorrem falhas no tratamento, e isso pode ser devido à dificuldade do antifúngico alcançar o local infectado (Dogra *et al.*, 2021). Em muitos casos é recomendada a remoção cirúrgica do tecido afetado em conjunto com a terapia antifúngica. No entanto, existem poucos agentes antifúngicos disponíveis na clínica, os quais são realmente efetivos no tratamento da mucormicose (Katragkou, Walsh e

Roilides., 2014). Os fármacos recomendados para o tratamento da mucormicose pertencem às classes dos polienos e a dos azóis (Cornely *et al.*, 2019).

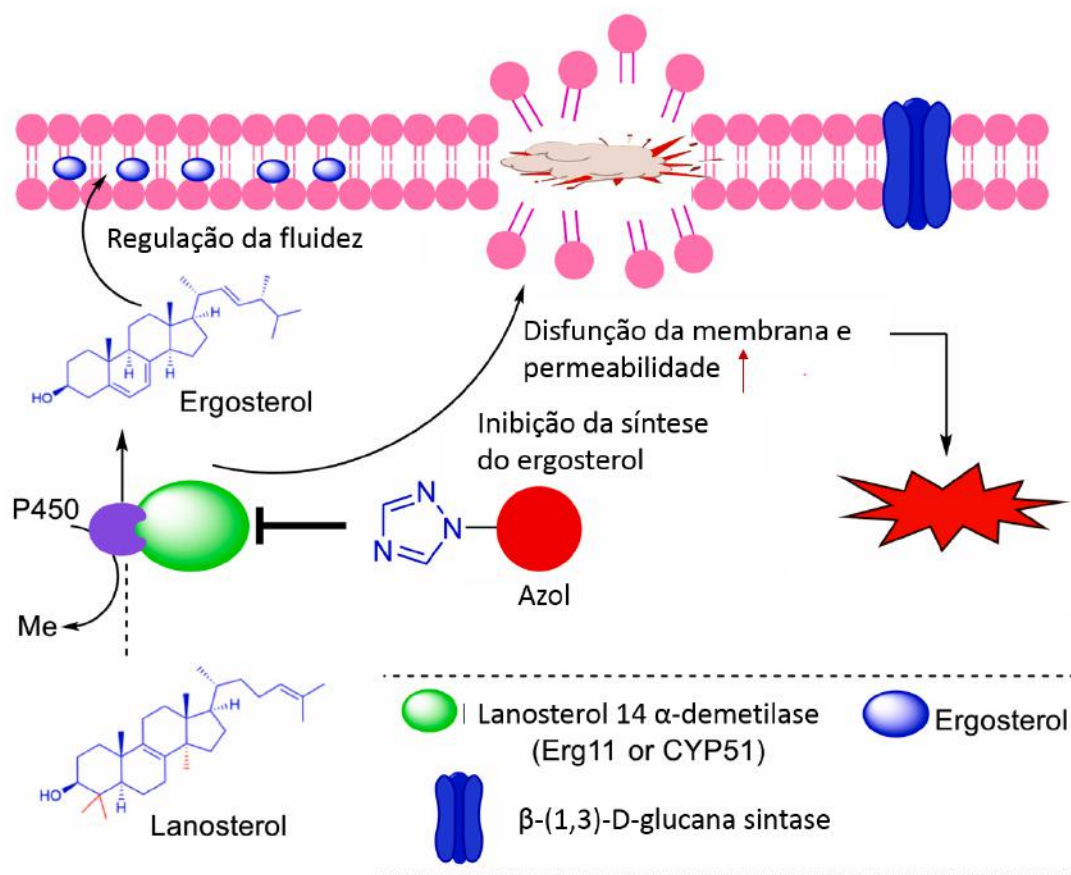
O polieno mais utilizado na clínica é a Anfotericina B, sendo o primeiro fármaco utilizado para tratamento de micoses invasivas e atualmente continua sendo o único polieno nesta posição (Johnson, 2021). Seu mecanismo de ação é baseado na ligação direta com o ergosterol, um esterol importante presente na membrana celular fúngica, o que leva a formação de poros resultando no extravasamento de componentes intracelulares e alteração na permeabilidade da membrana, levando ao colapso celular (**Figura 4**) (Hussain *et al.*, 2023). A anfotericina B apresenta dois domínios, uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. Estes domínios são estruturas importantes para a ação deste antifúngico. A micosamina presente na estrutura da Anfotericina B é responsável por promover a interação direta entre a anfotericina B com o ergosterol (Kamiński, 2014; Cavassin *et al.*, 2021; Hussain *et al.*, 2023).



**Figura 4:** Mecanismo de ação da anfotericina B. AmB se liga ao ergosterol formando canais iônicos na membrana. Levando a permeabilidade da membrana. Além disso induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio levando a efeitos tóxicos na célula fúngica. AmB: Anfotericina B, ROS: espécies reativas de oxigênio (adaptado Hussain *et al.*, 2023).

A maioria das diretrizes internacionais recomenda a anfotericina B como terapia de primeira linha, na sua forma intravenosa, para o tratamento da mucormicose. A anfotericina B apresenta uma boa atividade antifúngica para a maioria dos mucormicetos, exceto para espécies do gênero *Cunninghamella* e *Apophysomyces* que apresentam maior resistência a este fármaco (Skiada *et al.*, 2018; Cornely *et al.*, 2019). Entretanto o uso de anfotericina B convencional é prejudicado pela baixa biodisponibilidade oral, toxicidade aguda relacionada à infusão e pela nefrotoxicidade. Como alternativa, o uso das formulações lipídicas de anfotericina B são altamente recomendadas na clínica, devido ao seu perfil de tolerabilidade e toxicidade mais favorável, podendo ser administrados em altas doses embora sua formulação lipídica seja menos tóxica ainda apresentam riscos aos efeitos colaterais do fármaco em longo prazo (Van Daele *et al.*, 2019; Walsh *et al.*, 2001; Smith e Leem, 2022). Em 2015, um estudo realizado na Índia, demonstrou que a taxa de sobrevivência entre os pacientes com mucormicose tratados com a AmB de formulação lipídica foi de 88%, enquanto a taxa de sobrevivência dos pacientes tratados com a formulação convencional foi de 66% (Bala *et al.*, 2015).

Os fármacos azólicos compreendem a classe com mais agentes antifúngicos presentes na clínica. Esta classe é subdividida de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel heterocíclico: imidazólicos (2 nitrogênios) e triazólicos (3 nitrogênios) (Ahmadi *et al.*, 2022). Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (CYP51), a qual converte lanosterol em ergosterol, inibindo a síntese do ergosterol comprometendo a integridade da membrana celular fúngica (**Figura 5**) (Hussain *et al.*, 2023). A presença de anéis azólicos em sua estrutura é de extrema importância para atividade antifúngica, devido à interação de um dos átomos de nitrogênio presente no anel heterocíclico com o grupo heme presente no sítio catalítico da enzima, impedindo a ligação do substrato (Shafiei *et al.*, 2020). Embora esta classe apresente uma ampla variedade de agentes antifúngicos, os triazólicos são frequentemente utilizados em pacientes imunocomprometidos em tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas, devido a diversas formulações que os triazóis apresentam e uma maior tolerabilidade (Nivoix, Ledoux e Herbrecht, 2020).



**Figura 5:** Mecanismo de ação dos triazólicos. A inibição da síntese do ergosterol causa disfunção na membrana e aumento da permeabilidade, ocasionando lise e morte celular (adaptado Hussain *et al.*, 2023).

Em mucormicetos os derivados azólicos são utilizados na maioria das situações como terapia de segunda linha, quando o tratamento com anfotericina B é ineficaz. Seu uso para tratar a mucormicose ainda é limitado devido a variabilidade na susceptibilidade das espécies aos derivados azólicos. Isavuconazol e posaconazol apresentam melhores atividades *in vitro* contra os Mucorales em comparação aos outros derivados azólicos como itraconazol e voriconazol que apresentam mínima ou nenhuma atividade antifúngica (Courtney e Lee, 2022). O isavuconazol é o agente antifúngico aprovado para o tratamento da mucormicose. Sua administração pode ser feita pela via intravenosa ou pela via oral, sendo administrada pela sua fórmula de pró fármaco sulfato de isavuconazônio (Kovanda, Maher e Hope, 2016). O isavuconazol apresenta espectro antifúngico semelhante à anfotericina B e maior tolerabilidade. Diferente de outros derivados azólicos, o isavuconazol tem menor interação fármaco-fármaco e ausência de efeitos nefrotóxicos (Kovanda, Maher e Hope, 2016). Foi visto em estudos que o

isavuconazol administrado junto com imunossupressores como ciclosporina, ácido micofenólicos, prednisolona, sirolimus e tracolimo apresentaram menor interação fármaco-fármaco e baixa alterações farmacocinéticas, possibilitando a administração do isavuconazol em pacientes transplantados que apresentam infecções fúngicas (Groll *et al.*, 2017). No entanto, sua concentração inibitória mínima varia de acordo com a espécie de mucormicetos. Posaconazol é o fármaco utilizado após a terapia de resgate, ou quando a anfotericina B não apresenta efeito no tratamento. Assim como isavuconazol sua concentração varia de acordo com a espécie e apresenta eficácia com a maioria das espécies fúngicas. No entanto, espécies do gênero *Rhizopus* e *Mucor* apresentam maior resistência, sendo ambas as espécies mais encontradas na clínica (Salmanton-Garcia *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2023). A resistência aos fármacos azólicos ocorre provavelmente por mutações que levam a substituição de aminoácidos na lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase ou pela expressão de transportadores ABC responsáveis pelo efluxo de fármacos (Ganesan *et al.*, 2022; Xisto *et al.*, 2023a).

Na prática clínica, abordagens de terapia antifúngica combinadas são frequentemente consideradas e visam ampliar o espectro de ação antifúngica, minimizar o desenvolvimento de resistências e/ou reduzir a toxicidade (Johnson e Perfect, 2010). Estudos *in vivo* demonstraram que a combinação de anfotericina B lipossomal e micafungina ou anidulafungina apresentaram efeito sinérgico e maior sobrevida em camundongos neutropênicos ou com diabetes com altos níveis de cetoacidose em situação de mucormicose disseminada (Ibrahim *et al.*, 2008). Embora os fármacos da classe da equinocandina não apresentem efeito contra Mucorales em testes de suscetibilidade *in vitro*, em terapias combinadas têm demonstrado melhora na sobrevivência em comparação com monoterapias (Denning, 2003; Ibrahim *et al.*, 2008). Além disso, a terapia combinada de isavuconazol e anfotericina B tem demonstrado resultados promissores em modelos murinos (Gebremariam *et al.*, 2021). A terapia combinada para o tratamento de mucormicose tem sido encorajada devido aos altos índices de mortalidade e baixa disponibilidade dos antifúngicos monoterápicos (Meena, Kumar e Bohra, 2023).

Alguns medicamentos são contraindicados em casos de suspeitas e/ou tratamento de mucormicose. Voriconazol é um triazol de amplo espectro utilizado para tratamento de aspergilose, candidíase, fusariose e é um antifúngico utilizado como profilaxia em pacientes transplantados ou em pacientes com doenças hematológicas (Sharifpour *et al.*,

2018). Embora apresente boa atividade antifúngica para diversas espécies como *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp., em tratamento de mucormicose este fármaco não é recomendado, devido a sua baixa atividade antifúngica contra essas espécies (Donnelly, e Pauw, 2004; Courtney, e Lee, 2022). Além disso, foi relatado que pacientes com doenças hematológicas e transplantados tratados com voriconazol como profilaxia, apresentavam maiores riscos de desenvolver mucormicose grave, com letalidade variando de 44% a 73% (Kottarathil *et al.*, 2023). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que cepas de *R. oryzae* expostas ao voriconazol alteram o crescimento e a virulência, sugerindo que o voriconazol pode influenciar a expressão de fatores de virulência em *R. oryzae*, aquisição de ferro e secreção de proteases e toxinas, que são essenciais para a invasão do hospedeiro. (Lamari *et al.*, 2009). A deferoxamina é um quelante de ferro usado em tratamento de toxicidade ocasionada por sobrecarga de ferro. A utilização de deferoxamina aumenta o risco de infecção por mucormicose, embora o fármaco seja utilizado como quelante de ferro, fungos do gênero *Rhizopus* spp. se apropriam do mecanismo de ação do fármaco para maior obtenção de ferro livre presente no hospedeiro (Ibrahim, 2014).

### **1.8. Reposicionamento de fármacos, uma estratégia para aumentar o arsenal terapêutico antifúngico.**

A morbidade e a mortalidade em casos de infecções fúngicas têm aumentado nos últimos anos (Zhang *et al.*, 2021). As terapias e o arsenal antifúngico atual são limitados devido aos altos níveis de toxicidade e baixa suscetibilidade. Portanto é de extrema importância o estudo de novas abordagens terapêuticas (Butts, Palmer e Rogers, 2017). No entanto o processo de desenvolvimento de novos fármacos com propriedade antifúngica é desafiador, uma vez que as células fúngicas são células eucarióticas e apresentam semelhanças evolutivas com as células de animais, o que significa que alvos terapêuticos específicos que possam ser seletivamente inibidos, resultando em uma menor toxicidade seletiva para as células fúngicas são limitados (Peyclit *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de novos fármacos é complexo, lento, possui altos custos e baixa probabilidade de sucesso. Estima-se uma necessidade de 10 a 14 anos para conclusão de todo processo, desde a descoberta até a aprovação pela Administração de Alimentos e Medicamentos - FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) com custos

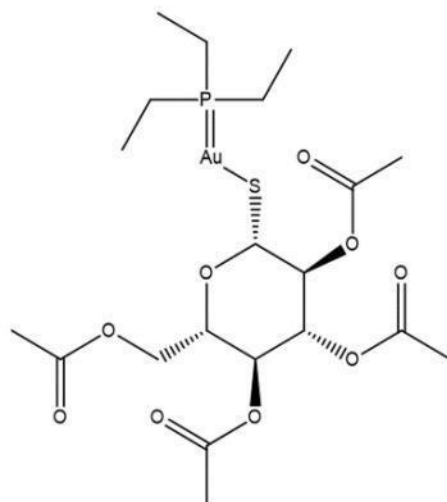
aproximados de 2 bilhões de dólares, além disso a taxa de sucesso em desenvolvimento de um novo fármaco fica na média de 2,01%. (Yeu *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2022). O reposicionamento de fármacos, vem como uma estratégia de identificar medicamentos que estão presentes na clínica ou estão em fase avançada de testes clínicos e realocá-los para uma designação diferente daquela que foi comercializada ou testada inicialmente (Peyclit *et al.*, 2021). Esta estratégia apresenta baixo custo, menor tempo de desenvolvimento, além de demonstrar perfis farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicidade previamente conhecidos. Nos últimos anos tem sido muito utilizado na busca de fármacos para o tratamento de diversas infecções como fúngicas, bacterianas, virais, parasitárias e para o tratamento de doenças cardiovasculares, oncológicas e Alzheimer (Peyclit *et al.*, 2021). Mesmo com o aumento do número de pesquisas em reorientar fármacos, ainda há poucos relatos de fármacos que chegaram à fase clínica. Alguns exemplos de reposicionamento de sucesso foi a utilização do antifúngico anfotericina B para tratamento de leishmaniose e medicamentos anti-malárico, como a pirimetamina, para o tratamento de toxoplasmose (Prajapati *et al.*, 2012; Dunay *et al.*, 2018). Estudos demonstraram que a sertralina, um antidepressivo, possui atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e outros fungos emergentes incluindo *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Alternaria spp.* e *Curvularia spp.*, além de sinergismo com a anfotericina B (Zhai *et al.*, 2012; Villanueva-Lozano *et al.*, 2020). Atualmente, a sertralina encontra-se em fase de testes clínicos para essa nova indicação. Além da sertralina, outros fármacos com diferentes mecanismos de ação, como antisépticos, antineoplásicos, auranofina e ribavirina, tem se mostrado promissores contra fungos multirresistentes, incluindo *Scedosporium*, *Fusarium* e mucormicetos (Peyclit *et al.*, 2021), afirmando que o reposicionamento de fármacos é uma estratégia promissora em expandir o arsenal terapêutico antifúngico.

Diversas estratégias podem ser utilizadas para otimizar o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Uma delas é a triagem a partir de bibliotecas de compostos, que tem o objetivo de identificar compostos não antifúngicos que apresentem propriedades antifúngicas a partir de um portfólio contendo centenas ou milhares de compostos (Samby *et al.*, 2022). Recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou a potente atividade antifúngica contra fungos do gênero *Scedosporium* e *Lomentospora*, *in vitro*, a partir de uma biblioteca de compostos chamada *Pathogen Box*, a partir da qual foram investigados o efeito da auranofina e do iodoquinol, fármacos utilizados para o

tratamento de artrite reumatóide e amebíases respectivamente, na atividade antifúngica tanto em células planctônicas e também em biofilmes pré formados ou em formação (Rollin-Pinheiro, 2021b). Além disso, foi demonstrado o efeito da miltefosina, composto usado para o tratamento de *Leishmania* em espécies de *Scedosporium* e *Lomentospora*, e mais recentemente contra espécies de Mucorales (Rollin-Pinheiro et al., 2021a; Xisto et al., 2023b).

### 1.9 Auranofina.

Auranofina (**Figura 6**) é um fármaco aprovado pela FDA em 1985 para tratamento primário de artrite reumatóide. Disponível na formulação oral, a auranofina é um fármaco metálico de ouro que apresenta ação de um pró-fármaco (Abdalbari e Telleria, 2021). O seu mecanismo de ação no tratamento de artrite reumatóide é baseada na inibição de vias inflamatórias e inibição das enzimas tioredoxina redutases (TrxRs) na forma citosólica TrxR1 e mitocondrial TrxR2. Estas enzimas têm importância em diversas vias bioquímicas e está envolvida na detoxificação de agentes oxidantes e radicais livres (Saccoccia *et al.*, 2014; Abdalbari, e Telleria, 2021). A inibição desta enzima permite que as células estejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo, conseqüentemente a apoptose (Sonzogni-Desautels e Ndao, 2021). Este fármaco tem efeitos tóxicos toleráveis pelo organismo hospedeiro, e os efeitos colaterais frequentes estão associados a perturbações gastrointestinais, como diarreia, e outros efeitos secundários são considerados raros (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2021). Nos últimos anos a auranofina tem sido um fármaco amplamente reposicionável demonstrando capacidade farmacológica, além do tratamento de artrite reumatóide, foi também relatado o potencial da auranofina na atividade anti-inflamatória, anticancerígena e anti-microbiana, oferecendo uma ampla aplicação clínica (Shen *et al.*, 2023).



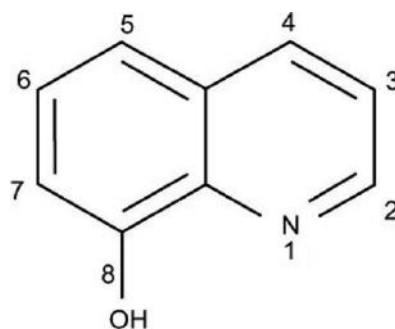
**Figura 6:** Estrutura química da Auranofina (Adaptado Rollin-Pinheiro, 2021).

A eficácia da auranofina foi testada frente a diversos microrganismos como contra o vírus SARS-COV-2, HIV, e contra parasitas como *Schistosoma mansoni* (Shen *et al.*, 2023). Thangamani e colaboradores demonstraram que a auranofina é um potente inibidor de bactérias Gram positivas, como cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, mas não foi capaz de inibir bactérias Gram negativas. Além disso, a auranofina também apresentou ação em múltiplos alvos como diferentes vias biossintéticas como de DNA, RNA, parede celular, além de inibir toxinas e parcialmente a síntese lipídica de *S. aureus*, demonstrando grande eficácia contra bactérias multirresistentes e mecanismos de ação diversos (Thangamani, Shankar, *et al.* 2016). A auranofina foi capaz de diminuir o agravamento da infecção por *Clostridium difficile* em modelo murino, em concentrações menores que a utilizada na clínica, sendo mais efetivo que a vancomicina e fidaxomicina (Abutaleb e Seleem, 2020). A auranofina demonstrou atividade antifúngica *in vitro* contra diversas espécies clinicamente relevantes, como espécies de *Candida*, *Scedosporium*, *Lomentospora*, *Rhizopus*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*, além de apresentar atividade anti-biofilme bacteriano e fúngico em catéteres, demonstrando um amplo espectro de ação (Wiederhold *et al.*, 2017; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2021; Felix *et al.*, 2023). Seu mecanismo de ação contra fungos não está estabelecido. Embora alguns autores cite que o mecanismo de ação em fungos seja a inibição da tioredoxina redutase, diferenças genéticas que regulam o sistema TrxRs resultam em diferenças de suscetibilidade entre as espécies (Shen *et al.*, 2023). Em contrapartida, Thangamani e colaboradores relataram que a auranofina tem como principal alvo proteínas reguladoras presentes na mitocôndria

como a Mia40, Acn9, e Coa4, em espécies de *Saccharomyces cerevisiae*. Neste trabalho foi demonstrado que a auranofina não teve como alvo os sistema TrxR/Trx, sugerindo que o mecanismo de ação da auranofina em células fúngicas seja a inibição de proteínas mitocondriais e não o TrxR/Trx (Thangamani *et al.*, 2017). Recentemente foi demonstrado que a pentamidina, um fármaco não antifúngico, pode aumentar a absorção celular da auranofina em leveduras do gênero *Candida*. Isto ocorre devido à ação da pentamidina na membrana celular fúngica, aumentando a permeabilidade, resultando em maiores efeitos da auranofina na célula fúngica. Os resultados sugerem que os efeitos da auranofina em células fúngicas são intracelulares e sobre diversos alvos, como observado em leveduras (Lin *et al.*, 2022).

### 1.10. Iodoquinol.

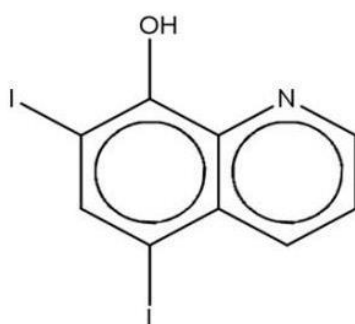
8-Hidroxiquinolina é uma sub-classe das quinolinas que apresenta uma variabilidade de efeitos biológicos, e o mecanismo de ação primário é a quelação de íons metálicos, os quais são essenciais para o metabolismo microbiano (Pippi *et al.*, 2019). A estrutura padrão é constituída por dois anéis, um anel de piridina ligado a um anel fenol no qual o grupamento hidroxila fica localizado na porção 8 da estrutura. O anel fenólico permite maior suscetibilidade a reações químicas e modificações estruturais da 8-hidroxiquinolina, nitrogênio e a hidroxila presente na estrutura são importantes para interação e quelação de íons metálicos (**Figura 7**) (Saadeh Sweidan e Mohammad, 2020). Membros dessa classe apresentam propriedades físicas e químicas diferenciais, que justificam o interesse em pesquisas devido seu amplo espectro de ação, além do desenvolvimento de novos compostos baseados em sua estrutura e propriedades químicas (Gupta, Luxami, e Paul, 2021). Atualmente, sabe-se que a 8-hidroxiquinolina apresenta propriedades anti-cancerígenas, anti-fúngica, anti-bacteriana, anti-leishmania, anti-viral, anti-Alzheimer e anti-asmático (Gupta, Luxami e Paul, 2021).



**Figura 7:** Estrutura 8-hidroxiquinolina (Prachayasittikul *et al.*, 2013).

Derivados da 8-hidroxiquinolina apresentam atividade antifúngica previamente descrita. O fármaco clioquinol tem sido utilizado para tratamento tópico de infecções fúngicas cutâneas superficiais em alguns países e ainda há poucos relatos na literatura sobre a resistência de espécies fúngicas utilizando clioquinol em seu tratamento (Pippi *et al.*, 2017).

Iodoquinol (**Figura 8**) é um fármaco derivado da 8-hidroxiquinolina que foi amplamente utilizado para tratamento de amebíase em formulação oral. Seu mecanismo de ação é baseado na quelação de íons metálicos (Rollin-Pinheiro, *et al* 2021). Apresenta efeitos colaterais quando utilizados na formulação oral como convulsões, encefalopatia, atrofia óptica que pode resultar em uma cegueira irreversível, limitando seu uso para tratamento de micoses sistêmicas (Wall, Herrera e Lopez-Ribot, 2019). No entanto, o iodoquinol apresentou atividade antifúngica e antibacteriana em infecções superficiais (Leifer e Steiner, 1950; Wall, Herrera e Lopez-Ribot, 2019). Além disso, recentemente foi demonstrado que o iodoquinol apresenta atividade *in vitro* contra espécies de *Sporothrix*, *Candida*, *Scedosporium* e *Lomentospora* (Wall, Herrera e Lopez-Ribot 2019; Borba-Santos, Vila e Rozental 2020; Rollin-Pinheiro, *et al.*, 2021).



**Figura 8:** Estrutura química do Iodoquinol (Adaptado Rollin-Pinheiro 2021).

## 2. JUSTIFICATIVA

Infecções fúngicas invasivas têm aumentado drasticamente nas últimas duas décadas (Lackner, Caramalho e Lass-Flörl, 2014). Dados da OMS estima que 300 milhões de pessoas em todo o mundo podem ser afetadas por infecções fúngicas graves (Fisher e Denning, 2022). Os fatores que contribuem para essa situação são o aumento de pacientes imunocomprometidos, pacientes com câncer, pacientes transplantados, doenças hematológicas, e tratamentos com imunossupressores. Além disso, durante a pandemia da COVID-19, observou-se uma notável correlação entre a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e a co-infecção por outras espécies fúngicas. Isso ocorreu principalmente em pacientes que receberam terapia com esteroides como parte do tratamento para a COVID-19, resultando em um aumento significativo nos casos de infecções fúngicas, como os de mucormicose (Nagalli e Kikkeri, 2021; Pasquier, 2023).

Devido a suas características angioinvasiva e necrosante a mucormicose apresenta altas taxas de mortalidade, principalmente em pacientes com doenças subjacentes, que são mais suscetíveis a uma maior gravidade da infecção. Além disso, o manejo clínico dessas infecções é extremamente desafiador, visto que o uso prolongado de anfotericina B leva a efeitos tóxicos e a maioria das espécies apresentam resistência aos principais agentes terapêutico antifúngico disponível na clínica (Katrakou e Roilides, 2014). Esse cenário profundamente preocupante levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incluir os fungos da ordem Mucorales na lista de patógenos fúngicos com potencial ameaça à saúde global (OMS, 2022).

Desse modo, torna-se imprescindível a busca, a identificação e o desenvolvimento de novos fármacos que apresentem boa atividade antifúngica para espécies de Mucorales, considerando a relevância dessas espécies como patógenos fúngicos. O reposicionamento de fármacos é uma alternativa de curto prazo, com objetivo de identificar uma nova indicação terapêutica para fármacos que estão presentes na clínica ou que estão em fase avançada de teste clínico. Assim, o reposicionamento de fármacos é uma das possibilidades de aumentar o arsenal terapêutico para o tratamento de infecções fúngicas. Este presente trabalho propõe a avaliação da atividade antifúngica da auranofina e do iodoquinol contra fungos da ordem Mucorales.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito antifúngico da auranofina e iodoquinol nas espécies de *Rhizopus oryzae*, *Mucor velutinosus* e *Cunninghamella* sp

#### 3.2. Objetivos específicos

- i. Determinar a concentração mínima inibitória (MIC) da auranofina e do iodoquinol;
- ii. Avaliar a cinética de crescimento na ausência ou presença da auranofina ou iodoquinol
- iii. Avaliar a atividade dos fármacos frente ao biofilme fúngico pré formado;
- iv. Avaliar a interação entre os fármacos selecionados com os antifúngicos anfotericina B e posaconazol;
- v. Análise da susceptibilidade dos fungos aos fármacos após a exposição a estressores de membrana plasmática (SDS), estressor osmótico (NaCl) e oxidativo (Menadiona);
- vi. Avaliar alterações de parâmetros celulares causados pela auranofina e iodoquinol pelo uso de marcadores fluorescentes.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS.**

### **4.1. Microrganismos em condições de cultivo.**

*Rhizopus oryzae* UCP1295, isolado da caatinga brasileira, cedido pela professora Galba Maria de Campos Takaki, UFPE, *M. velutinosus* H136BO e *Cunninghamella* sp. B926, foram isolados de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF - UFRJ) e cedidos pelo professor Marcio Nucci, UFRJ, Rio de Janeiro serão utilizados neste trabalho. O pré-inóculo de cada espécie foi mantido sob agitação em Erlenmeyer contendo 200 ml de meio comercial batata dextrose durante 7 dias, à temperatura ambiente.

### **4.2. Obtenção de esporos**

Para a obtenção dos esporos, *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. foram crescidos em meio ágar batata dextrose (BDA), a temperatura ambiente durante 7 dias. Após o crescimento, 8 ml de tampão fosfato de sódio (PBS) 0.01M estéril, pH 7,2 foram adicionados à superfície da placa de crescimento e os esporos foram removidos com auxílio de uma espátula estéril. A suspensão será filtrada em tubo estéril de 50 ml com auxílio de um filtro com a trama de 40 µm (Cell Strainer, BD Falcon, San José, EUA) e em seguida foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm (rotações por minuto). Após esse tempo, descarta-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 1 ml de PBS 0,01 M. Em seguida, os esporos foram lavados duas vezes com PBS estéril e centrifugados, mantendo volume final de 1ml. O estoque da suspensão fúngica foi contado em câmara de Neubauer em microscópio óptico, objetiva de 40 x (Olympus BX50-F4, Olympus Optical Co., Tóquio, Japão).

### **4.3. Ensaio para a determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Mínima Fungicida.**

A concentração inibitória mínima (MIC) foi baseada na metodologia preconizada pelo Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana– EUCAST (do inglês *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Taj-aldeen et al, 2016). A auranofina e o iodoquinol (Sigma-Aldrich, MO, USA) foram diluídos em 100% de

DMSO para obtenção da solução estoque a 3 mM e forma mantidas a -20°C. A suspensão dos esporos de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. ( $3 \times 10^4$  / poço) foram incubada em placas de 96 poços em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO, USA). A auranofina e o iodoquinol foram diluídos seriadamente (40 – 0.156  $\mu$ M) e adicionados na microplaca de 96 poços. Após 72 h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a viabilidade celular será avaliada através do ensaio de redução do XTT (XTT sodium salt – 0.5 mg/ml – Sigma Aldrich) e lida em espectrofotômetro a 490nm (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2019). O MIC foi determinado como a menor concentração dos fármacos que foi capaz de inibir pelo menos 50% do crescimento fúngico. Anfotericina B e Posaconazol foram utilizados como padrão nos experimentos, pois são fármacos de escolha para o tratamento da mucormicose. Anfotericina B e Posaconazol foram diluídos seriadamente (40 - 0.156  $\mu$ M) e serão usados como descrito acima. A Concentração Mínima Fungicida (MFC) foi determinada após o ensaio de MIC. Uma alíquota de 50  $\mu$ l de cada poço será semeada em BDA, na presença e ausência de fármacos e incubada à 37°C por 48 h. Após a incubação, a MFC foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico (Borba-Santos, Vila e Rozental, 2020; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2021).

#### **4.4. Ensaio de cinética de crescimento fúngico.**

A cinética de crescimento das espécies *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. foram avaliadas na presença e ausência da auranofina ou iodoquinol, a fim de avaliar o efeito dos fármacos na geminação fúngica. Primeiramente uma alíquota de 100  $\mu$ L da solução contendo diferentes concentrações de auranofina ou iodoquinol em meio RPMI 1640 (concentrações correspondentes a  $\frac{1}{2}$  MIC dos fármacos) foi adicionada em microplacas de 96 poços, seguida da adição de uma alíquota de 100 $\mu$ L de suspensão fúngica contendo  $3 \times 10^4$  esporos/poço. O crescimento fúngico foi monitorado por leitura da densidade óptica a cada hora em 660nm, durante um período total de 24h de incubação, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.5. Ensaio de inibição do biofilme pré-formado.**

A inibição do biofilme pré-formado foi analisada de acordo com Rollin-Pinheiro e colaboradores (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2019). A suspensão de esporos das espécies *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. foi adicionada em cada poço da microplaca

de 96 poços ( $10^5$  / poço) em RPMI 1640. Após 24 h incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para a formação do biofilme, o sobrenadante foi removido e o meio RPMI será adicionado na ausência (controle do crescimento) ou na presença da auranofina ou iodoquinol nas concentrações de 4xMIC até 1/4 MIC. Após a adição dos fármacos, a placa foi incubada novamente a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para avaliar o efeito dos fármacos na presença do biofilme pré-formado. Foram utilizados três parâmetros para avaliar o biofilme pré-formado: cristal violeta para avaliar a biomassa total, safranina para avaliar a matriz extracelular e XTT para avaliar a atividade metabólica e lida em espectrofotômetro a 560nm e 490nm (Rollin-Pinheiro et al., 2019). Além disso, antes da avaliação dos parâmetros foi retirada fotos dos poços do biofilme analisadas na ausência ou presença dos fármacos em microscópio óptico invertido (B900, Biotika, Brasil).

#### **4.6. Susceptibilidade de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. aos estressores na presença de auranofina ou iodoquinol.**

Para avaliar a susceptibilidade ao Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), NaCl, e menadiona, esporos de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. foram incubados em microplacas de 96 poços ( $10^4$  / poço) em RPMI 1640 na presença de diferentes concentrações de auranofina ou iodoquinol (80 – 1.25 µM) e co-incubados com concentrações fixas de SDS, NaCl ou menadiona. foram utilizadas concentrações sub inibitórias SDS, que atua como estressor de membrana, de NaCl, que atua como estressor osmótico, e de menadiona, que atua como estressor oxidativo. A concentração de SDS foi de 45 µg/ml para *R. oryzae* e *M. velutinosus*, e de 90 µg/ml para *Cunninghamella* sp. A concentração de NaCl será de 1% para as três espécies testadas. Células cultivadas na ausência de auranofina ou iodoquinol foram consideradas como controle positivo. A concentração de menadiona foi de 30 µM. Após 72 h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do XTT e lida em espectrofotômetro a 490nm (Rollin-Pinheiro et al., 2019).

#### 4.7. Método “checkerboard” para análise dos efeitos combinatórios entre os fármacos com agentes antifúngicos.

O ensaio para a análise dos efeitos combinatórios foi realizado pelo método *checkerboard*, seguindo a metodologia estabelecida pelo EUCAST (Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2008).

Foram analisadas as seguintes combinações: auranofina + posaconazol, auranofina + anfotericina B, iodoquinol + posaconazol, iodoquinol + anfotericina B. Para a combinação, foram utilizadas duas microplacas de 96 poços. Na primeira microplaca, foram preparadas diluições seriadas (horizontalmente) de anfotericina B ou posaconazol (5 – 0.78 $\mu$ M). Na segunda microplaca foram preparadas diluições seriadas (verticalmente) de auranofina ou iodoquinol (20 – 0.313  $\mu$ M). Após o preparo das diluições, 50  $\mu$ l de cada poço da segunda microplaca foram transferidas para a primeira microplaca. Em seguida, 100  $\mu$ l da suspensão fúngica ( $3 \times 10^4$  / poço) de *R. oryzae* foram colocadas à primeira microplaca, de forma que o volume final em cada poço foi de 200  $\mu$ l. A microplaca foi incubada por 72 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular será avaliada por ensaio de redução XTT, e lida em espectrofotômetro a 490nm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A interação foi determinada pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI), de acordo com as seguintes fórmulas: (MIC combinados/ MIC fármaco A sozinho) + (Mic combinados/ MIC fármaco B sozinho). Os resultados foram classificados da seguinte forma: Efeito sinérgico, FICI < 0.5; indiferente FICI > 1 – 4.0; aditivo quando  $0,5 < FICI \leq 1,0$ ; efeito antagonista, FICI > 4.0 (Brilhante et al., 2020). Também será utilizado o modelo de independência Bliss que será realizado de acordo com Meletiadis, Zhao e colaboradores (Zhao *et al.*, 2014; Meletiadis *et al.*, 2006). A fórmula utilizada para avaliar a interação dos fármacos testados:  $E_{exp} = E(a) + E(b) - E(a) \times E(b)$ , onde  $E_{exp}$  é a eficácia dos fármacos combinados esperados e  $E_{obs}$  é a eficácia dos fármacos observados.  $E(a)$  é a eficácia dos fármacos testados (auranofina ou iodoquinol) e  $E(b)$  é a eficácia dos fármacos já utilizados na clínica (anfotericina B e posaconazol). Os resultados podem ser avaliados das seguintes formas: efeito sinérgico quando  $E_{obs} > E_{exp}$ ; indiferente ocorre quando  $E_{obs} = E_{exp}$ ; efeito antagonista ocorre quando  $E_{obs} < E_{exp}$ .

#### **4.8. Alterações nas células de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. causadas pela Auranofina e o Iodoquinol.**

Marcadores fluorescentes foram utilizados com o objetivo de analisar as alterações celulares causadas pela auranofina ou iodoquinol nas espécies de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. Concanalina A (Sigma-Aldrich, MO, USA) foi utilizada para avaliar unidades de manose da parede celular fúngica. Branco de Calcofluor (Sigma-Aldrich, MO, USA) foi utilizado para avaliar o conteúdo de quitina da parede celular. O conteúdo de lipídeos neutros será avaliado pelo marcador Nile Red (Sigma-Aldrich, MO, USA). As células foram crescidas na ausência (controle positivo) ou na presença de auranofina ou iodoquinol na concentração de  $\frac{1}{2}$  MIC por 72 h. Após a incubação, o conteúdo de meio será removido e os marcadores fluorescentes foram adicionados e incubados por 1 h a 37°C na ausência de luz. foram utilizadas as concentrações de 25 µg/ml de Concanalina A, 25 µg/ml de Branco de Calcofluor e 20 µg/ml de Nile Red para a marcação das células. Os poços foram lavados três vezes para a remoção dos marcadores e ressuspensos em PBS. A intensidade de fluorescência será medida usando leitor de microplaca SpectraMax 340 (Molecular Devices, CA, USA) nas seguintes condições: Concanalina A a 495 nm (excitação) e 520 nm (emissão); branco de Calcofluor a 350 nm (excitação) e 432 nm (emissão); Nile Red a 550 nm (excitação) e 635 nm (emissão).

#### **4.9. Análises estatísticas.**

Todos os testes foram analisados em triplicata em três conjuntos experimentais independentes. Os resultados experimentais são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os dados foram analisados por análise de variância não paramétrica de teste T unidirecional para comparar as diferenças entre os grupos (o grupo tratado com auranofina ou iodoquinol e o grupo controle sem o fármaco). As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism v5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O intervalo de confiança de 90% ou 95% foi determinado em todos os experimentos, considerando  $p < 0,05$  uma diferença estatisticamente significativa.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Ensaio para a determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Mínima Fungicida.

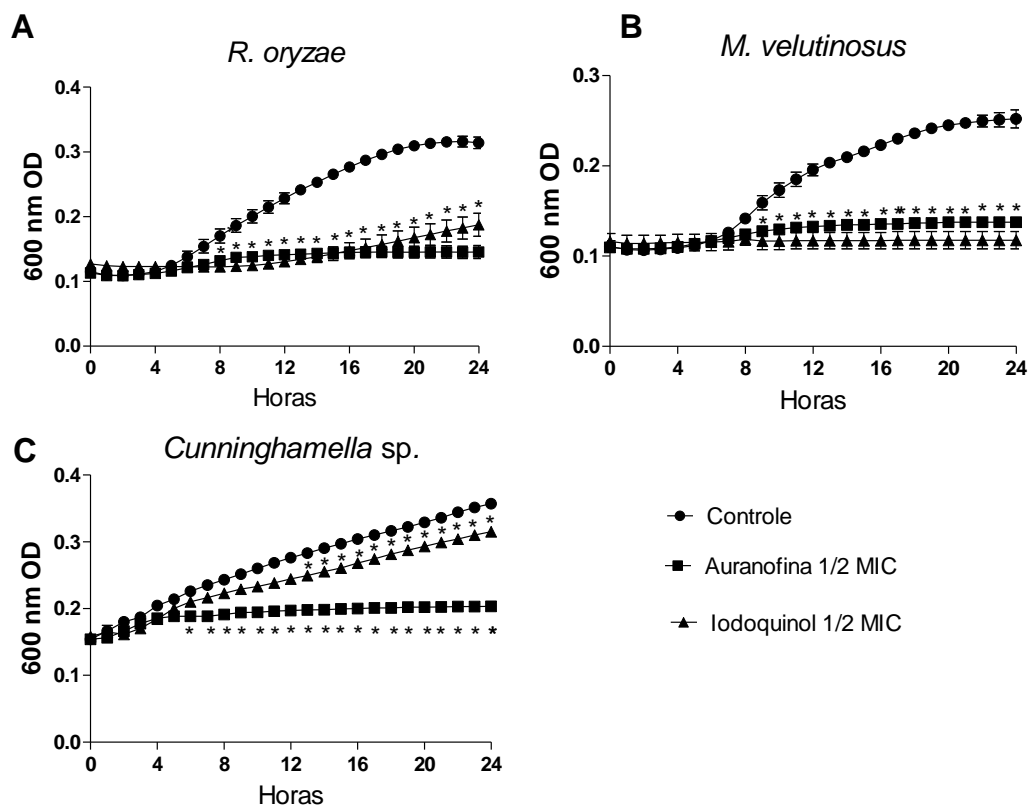
O potencial efeito inibitório e/ou fungicida da auranofina e do iodoquinol contra as espécies *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. foi avaliado por teste de microdiluição em caldo e a atividade desses fármacos foi determinada através da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Fungicida (MFC). Foram consideradas as concentrações que inibiram 50% e 70% da viabilidade respectivamente (MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>70</sub>). A auranofina foi capaz de atingir MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>70</sub> em concentrações de 10 µM a 20 µM respectivamente em *R. oryzae*. O iodoquinol foi capaz de atingir o MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>70</sub> de *R. oryzae* e *Cunninghamella* sp. (MIC<sub>50</sub> 10 µM e MIC<sub>70</sub> 20 µM). *M. velutinosus* se mostrou resistente para ambos os fármacos pois não houve inibição do crescimento com as concentrações testadas. Posaconazol e anfotericina B foram usadas como padrão nas análises, pois são as drogas de primeira escolha para o tratamento da mucormicose no ambiente clínico. O MIC<sub>50</sub> do posaconazol para *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. foi de 5 µM, 0.63-2.5 µM e 1.25 µM respectivamente. Posaconazol não apresentou ação fungicida para nenhuma das espécies testadas. O MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>70</sub> para *R. oryzae* foi de 0.313 µM. *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. apresentaram MIC<sub>50</sub> de 0.625 µM e 5 µM respectivamente. A anfotericina B não apresentou ação fungicida para nenhuma das espécies testadas (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Fungicida (MFC) contra *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp.

Espécies	Auranofina µM			Iodoquinol µM			Anfoterina B µM			Posaconazol µM		
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>70</sub>	MFC	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>70</sub>	MFC	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>70</sub>	MFC	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>70</sub>	MFC
<i>R. oryzae</i>	10	20	>40	10	20	40	0.313	0.313	>40	5	20	> 40
<i>M. velutinosus</i>	>40	>40	>40	>40	>40	>40	0.625	>40	> 40	0.63 - 2.5	>40	> 40
<i>Cunninghamella</i> sp.	>40	>40	>40	10	20	>40	5	5	> 40	1.25	5 - 10	> 40

## 5.2 Cinética de Crescimento.

A cinética de crescimento foi feita com o objetivo de observar o efeito inibitório dos fármacos durante 24h em concentrações de  $\frac{1}{2}$  MIC. O crescimento inicial das células controle (na ausência dos fármacos) foi observado após 8h de leitura das três espécies testadas. A auranofina conseguiu inibir o crescimento de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. nas primeiras 24h. O iodoquinol inibiu o crescimento de *M. velutinosus*, *R. oryzae* e parcialmente o crescimento de *Cunninghamella* sp. O resultado das curvas de crescimento dos fungos tratados com iodoquinol após 8h estão mostrados na **Figura 9**.

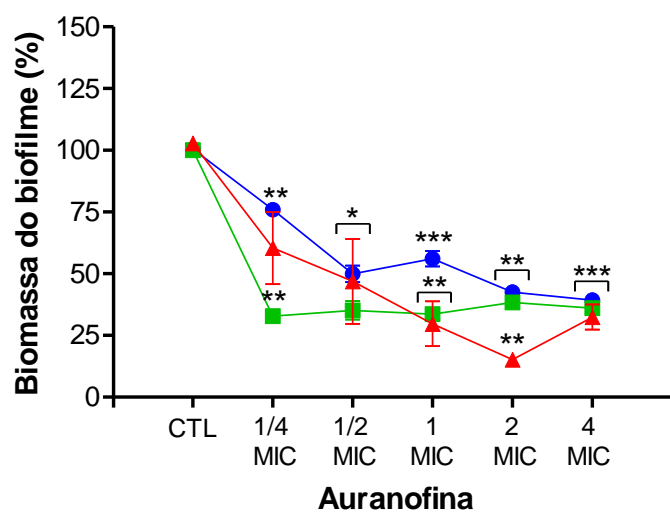
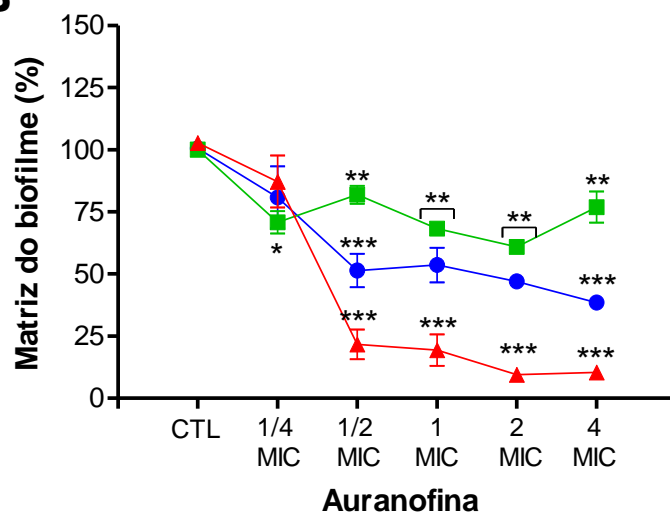
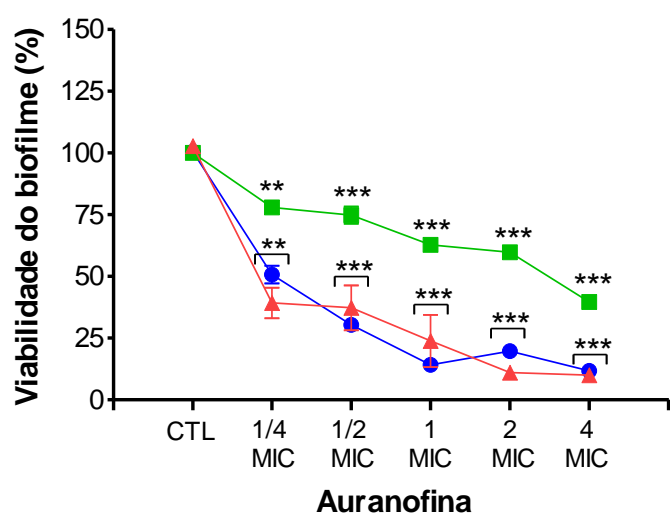


**Figura 9:** Cinética de crescimento das espécies de Mucorales. *R. oryzae* (A). *M. velutinosus* (b). *Cunninghamella* sp. (C). As células foram tratadas na ausência ou presença de auranofina ou iodoquinol em concentrações de  $\frac{1}{2}$  MIC a 36°C por 24h. \* $p < 0.05$ .

### 5.3 Ensaio de inibição do biofilme pré-formado.

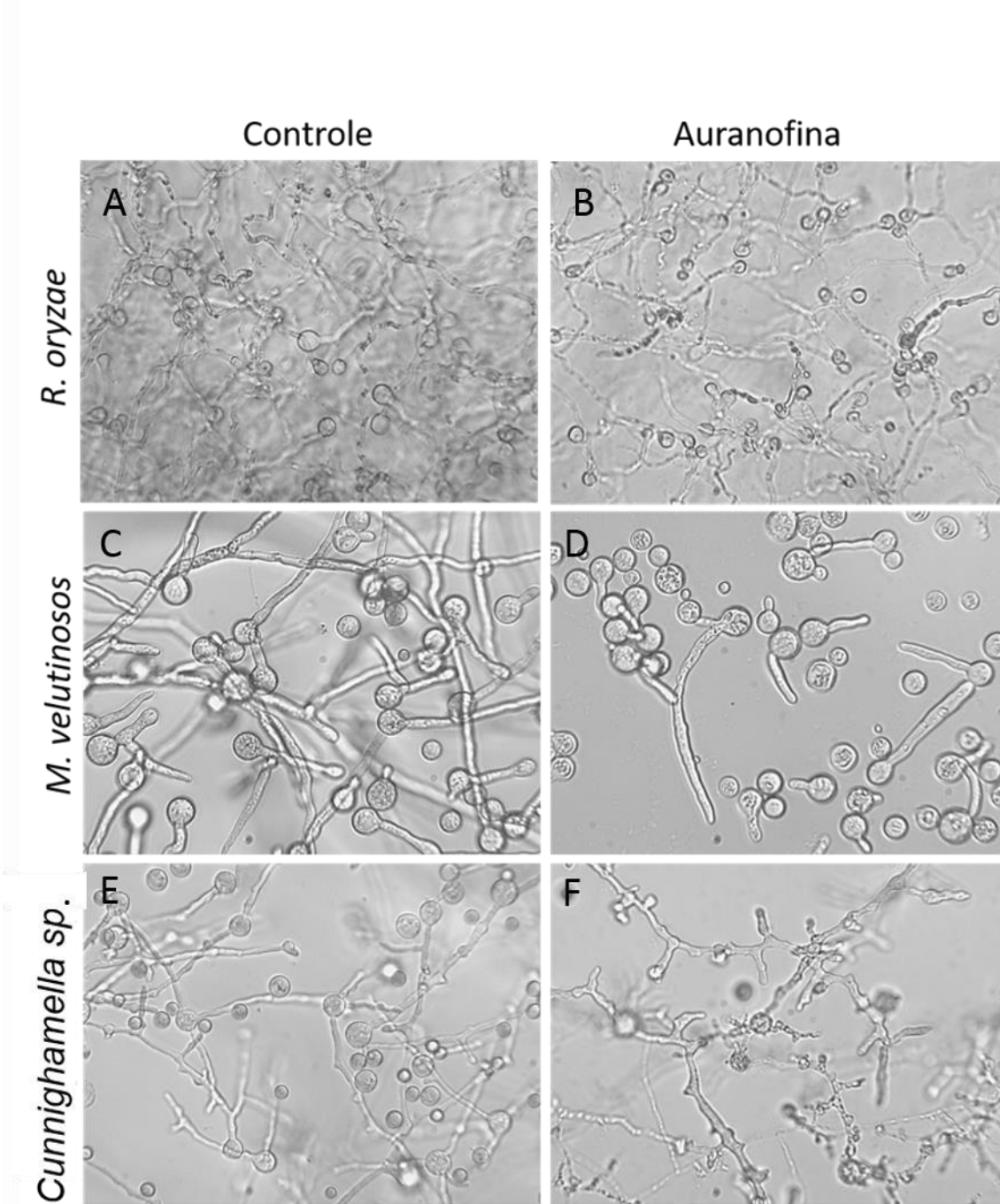
Já foi demonstrado na literatura que espécies de Mucorales apresentam a capacidade de formar biofilme, sendo uma estrutura altamente resistente aos fármacos utilizados na clínica (Meletiadis et al., 2006). Por esta razão é importante a avaliação do efeito de novos fármacos sobre o biofilme. Foi avaliado o potencial efeito da auranofina e do iodoquinol frente ao biofilme pré-formado em diferentes concentrações ( $\frac{1}{4}$  MIC<sub>50</sub> até 4 MIC<sub>50</sub>) (**Figura 10-13**).

A auranofina foi capaz de reduzir a biomassa de *R.oryzae* em 25%, *M. velutinosus* em 68%, *Cunninghamella* sp. em 40% a partir de  $\frac{1}{4}$  MIC (**Figura 10**). A matriz extracelular foi reduzida em aproximadamente 20% das três espécies a partir de  $\frac{1}{4}$  MIC. A viabilidade diminuiu para menos de 50% de *R. oryzae* e *Cunninghamella* sp. em concentração de  $\frac{1}{2}$  MIC, enquanto a viabilidade de *M. velutinosus* diminuiu para menos de 50% a partir de 4Xmic. (**FIGURA 10**). Na **Figura 11** é possível observar as alterações na organização do biofilme pré-formado de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. causada pela auranofina na concentração de 2xMIC<sub>50</sub>. Ao analisar a estrutura do biofilme na ausência ou na presença da auranofina foi possível observar alterações na estrutura do biofilme das três espécies por microscópio óptico invertido. Além disso a auranofina foi capaz de inibir a filamentação da espécie de *M. velutinosus* (**Figura 11**).

**A****B****C**

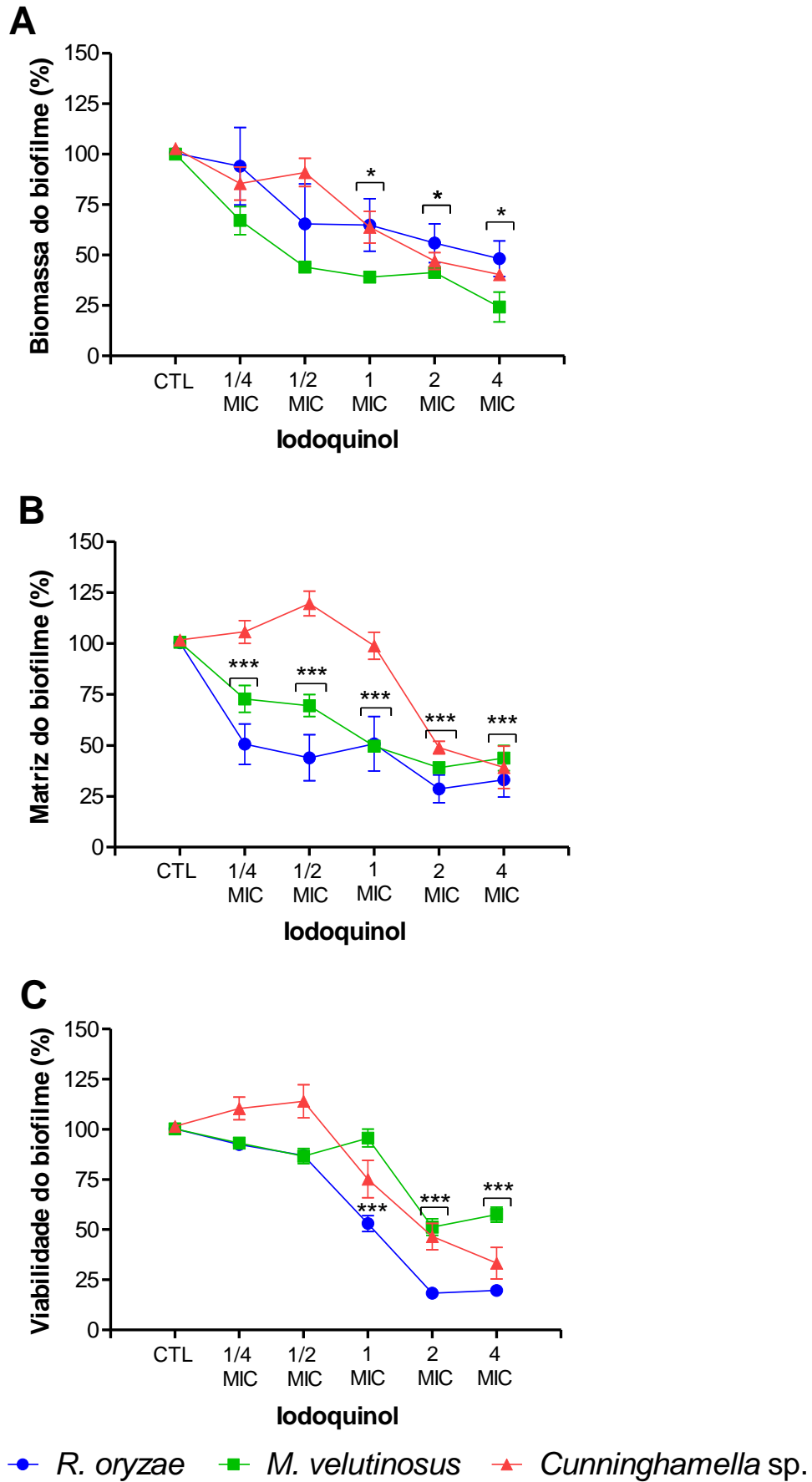
● *R. oryzae*    ■ *M. velutinosus*    ▲ *Cunninghamella* sp.

**Figura 10.** Efeito da auranofina no biofilme pré-formado de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* spp. (A-C). Quantificação da biomassa total do biofilme medida pela marcação com cristal violeta, da matriz extracelular medida pela marcação com safranina, e da viabilidade metabólica do biofilme medida pelo ensaio de redução do XTT. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

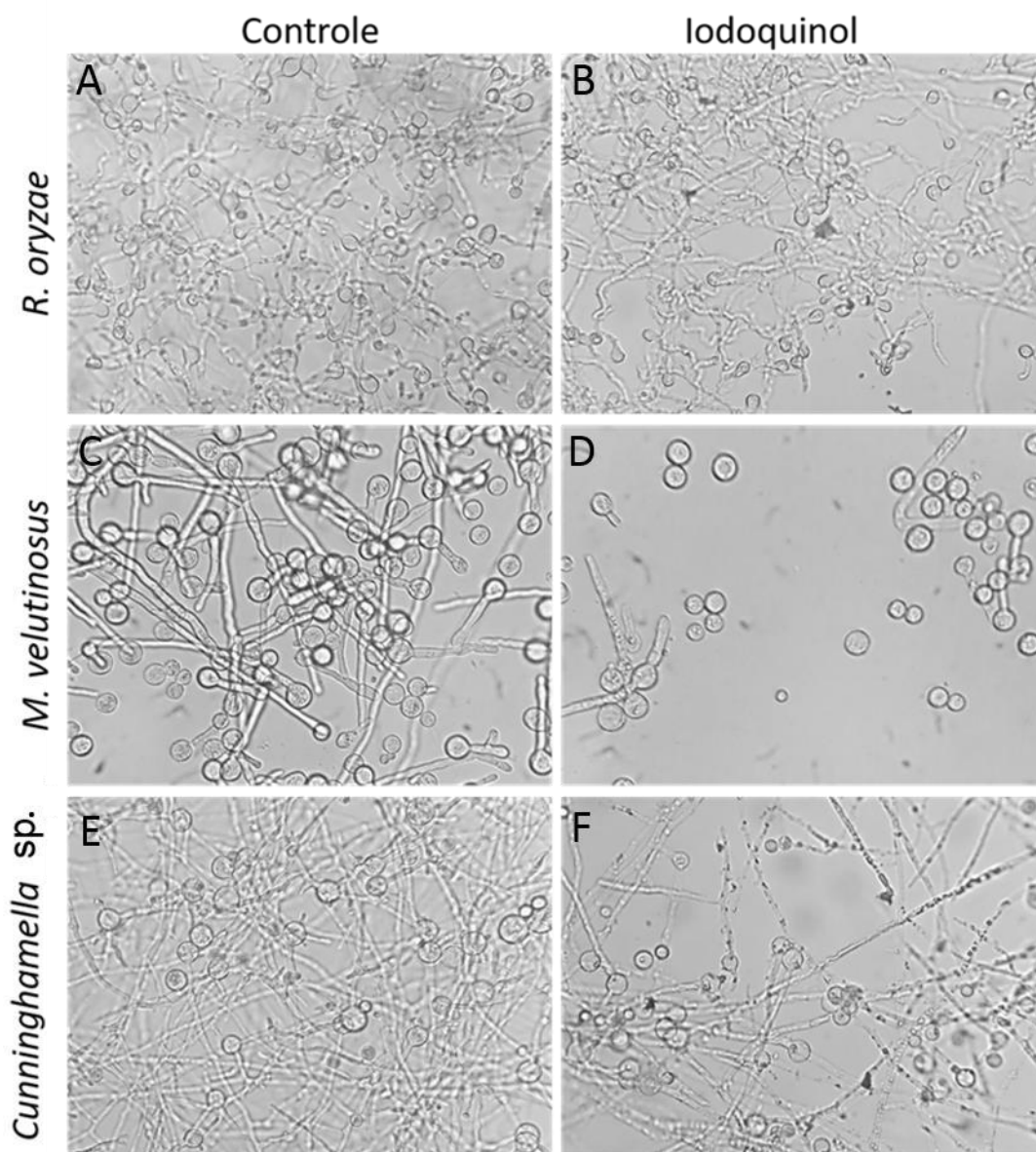


**Figura 11:** Alterações na organização do biofilme pré-formado de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* spp. causadas pela auranofina na concentração de 2 MIC. Aumento de 400x.

O iodoquinol foi capaz de reduzir a biomassa de *R. oryzae* e *Cunninghamella* sp. em aproximadamente 35% e de *M. velutinosus* em 50% a partir da concentração do MIC. A matriz extracelular foi reduzida para 50% de *R. oryzae* e *M. velutinosus* a partir da concentração do MIC e a matriz extracelular da *Cunninghamella* sp. somente é afetada a partir da concentração de 2xMIC. A viabilidade de *R. oryzae* foi reduzida em 50% a partir do MIC, enquanto para *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. a partir de 2xMIC. (**Figura 12**). Na **Figura 13** é possível observar as alterações na organização do biofilme pré-formado de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. causadas pelo iodoquinol na concentração de 2 MIC por microscópio óptico invertido. A morfologia do biofilme pré-formado das três espécies testadas foi alterada na presença de 2 MIC do iodoquinol (**Figura 13**). As espécies de *R. oryzae* e *Cunninghamella* sp. tratadas com iodoquinol demonstraram redução da biomassa fúngica e alterações morfológicas com hifas mais finas. *M. velutinosus* tratado com iodoquinol apresentou poucas formações de hifas (**Figura 13**).



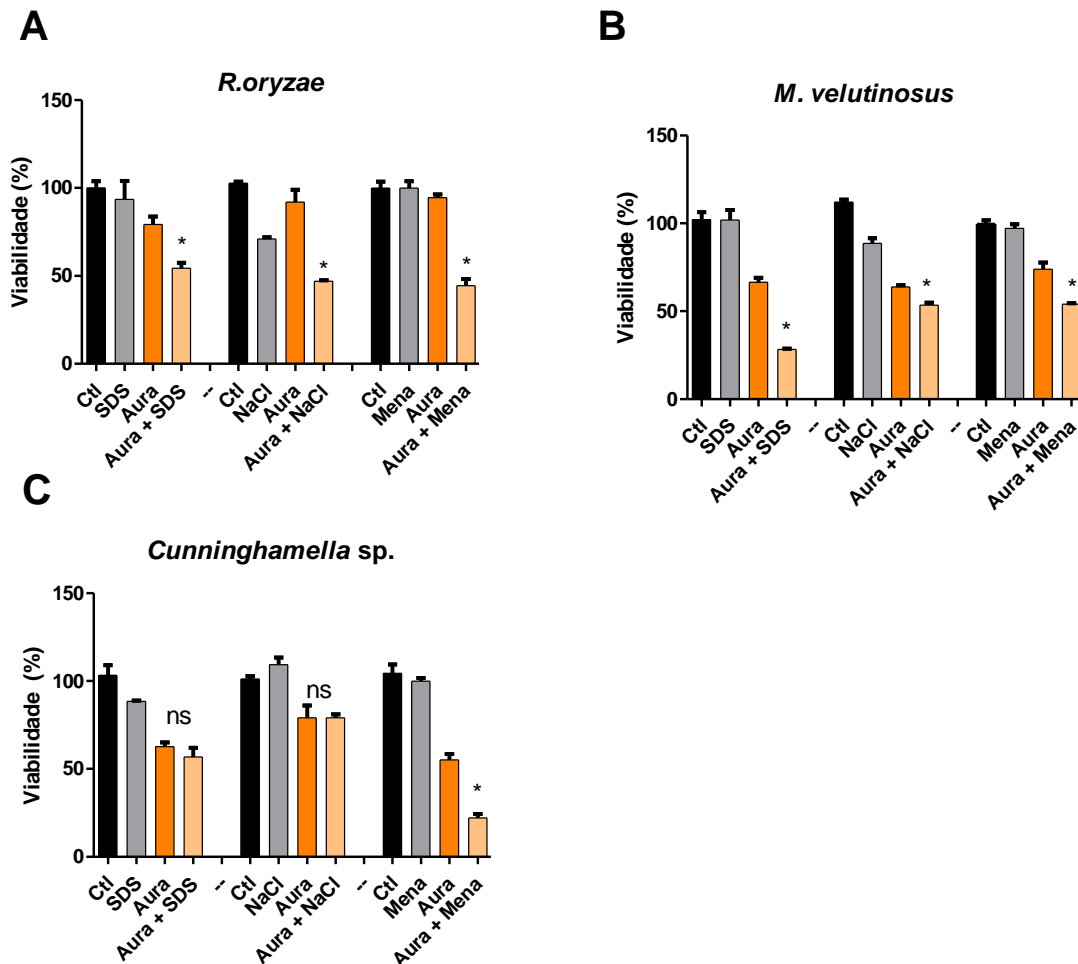
**Figura 12:** Efeito do iodoquinol no biofilme pré-formado de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. (A-C). Quantificação da biomassa total do biofilme medida pela marcação com cristal violeta, da matriz extracelular medida pela marcação com safranina, e da viabilidade metabólica do biofilme medida pelo ensaio de redução do XTT. \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 13:** Alterações na organização do biofilme pré-formado de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp., causadas pelo iodoquinol na concentração de 2 MIC. Aumento de 400x.

#### 5.4. Susceptibilidade de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. aos estressores na presença de auranofina ou iodoquinol.

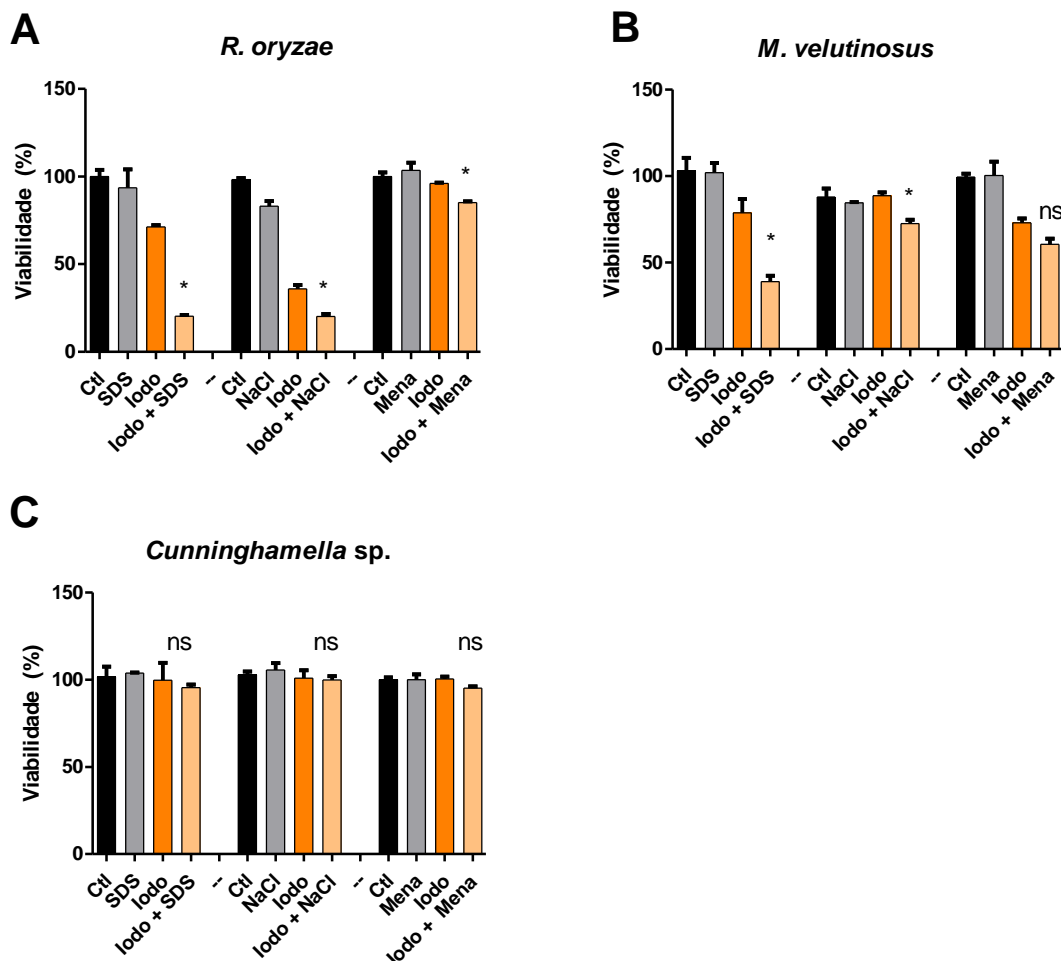
As espécies de *R. oryzae*, *M. velutinosus*, *Cunninghamella* spp. foram incubadas com auranofina na presença ou ausência dos estressores de membrana (SDS), oxidativo (NaCl) e osmótico (menadiona). por 72h a 37°C (**Figura 14**). A auranofina foi capaz de aumentar a susceptibilidade do *R. oryzae* e *M. velutinosus* a todos os estressores testados (**Figura 14 A e B**). A auranofina aumentou a susceptibilidade da *Cunninghamella* sp. apenas a menadiona, porém não alterou a susceptibilidade aos outros estressores (**Figura 14C**).



**Figura 14:** Susceptibilidade das espécies de Mucorales incubados com auranofina na ausência e presença dos estressores de membrana (SDS), osmótico (NaCl) e oxidativo (menadiona). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução XTT após 72h de incubação a 37°C. *R. oryzae* (A). *M. velutinosus* (B) *Cunninghamella* sp. (C)., \* $p < 0.005$ ; ns = não significativo.

As espécies de *R. oryzae*, *M. velutinosus*, *Cunninghamella* sp. foram incubadas com iodoquinol na presença ou ausência dos estressores de membrana (SDS), oxidativo (NaCl) e osmótico (menadiona) por 72h a 37°C (**Figura 15**). O iodoquinol foi capaz de aumentar a susceptibilidade de *R. oryzae* frente a todos os estressores testados (**Figura 15A**). O iodoquinol foi capaz de aumentar a susceptibilidade de *M. velutinosus* ao SDS e

NaCl (**Figura 15B**). O iodoquinol não foi capaz de alterar a susceptibilidade da *Cunninghamella* sp. frente a todos os estressores (**Figura 15C**).

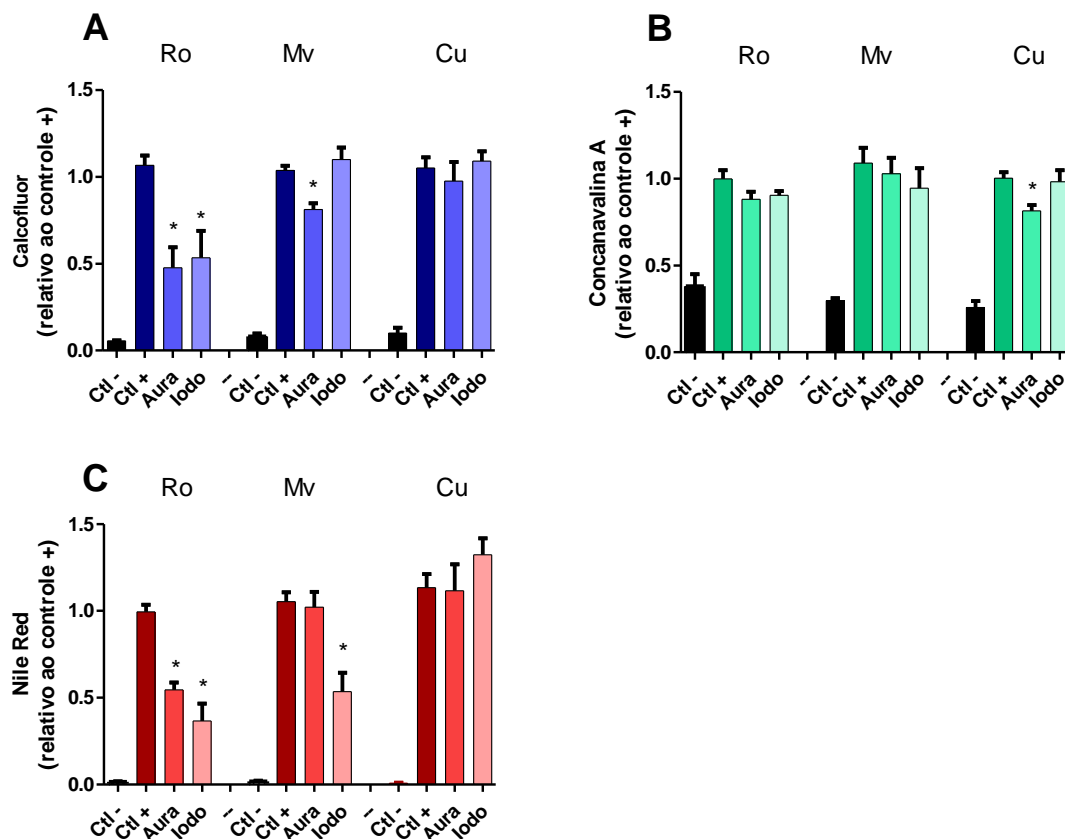


**Figura 15:** Susceptibilidade das espécies de Mucorales incubados com iodoquinol na ausência e presença dos estressores de membrana (SDS), osmótico (NaCl) e oxidativo (menadiona). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução XTT após 72h de incubação a 37°C. *R. oryzae* (A). *M. velutinosus* (B) *Cunninghamella* sp. (C)., \* $p < 0.005$ ; ns = não significativo.

### 5.5. Alterações celulares de espécie de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. causadas pela auranofina e o iodoquinol.

Com o objetivo de avaliar quais alterações celulares foram induzidas pela auranofina e iodoquinol, algumas marcações fluorescentes foram realizadas em *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. tratados com iodoquinol ou auranofina (**Figura 16**). As células não tratadas foram consideradas como controle. Branco de calcofluor foi utilizado para analisar o conteúdo de quitina, concanavalina A foi utilizada para avaliar unidades de manose e Nile Red para quantificar lipídeos neutros. A análise da parede

celular através da marcação com branco de calcofluor revelou que a auranofina foi capaz de reduzir quitina das espécies de *R. oryzae* e *M. velutinosus*, enquanto o iodoquinol foi capaz de reduzir quitina somente da espécie de *R. oryzae*. O iodoquinol não foi capaz de reduzir quitina na espécie de *M. velutinosus* e nenhum dos fármacos foi capaz de reduzir quitina de *Cunninghamella* sp. (**Figura 16A**). A avaliação do conteúdo de manose com concanavalina A revelou que somente o iodoquinol foi capaz de reduzir o conteúdo de manose de *Cunninghamella* sp., e não apresentou efeito nas espécies de *R. oryzae* e *M. velutinosus*. A auranofina não foi capaz de alterar o conteúdo de manose das três espécies testadas (**Figura 16B**). A quantificação de lipídeos neutros por Nile Red demonstrou que a auranofina foi capaz de reduzir o conteúdo de lipídios neutros da espécie de *R. oryzae* e o iodoquinol foi capaz de reduzir lipídeos das espécies de *R. oryzae* e *M. velutinosus*, enquanto que a espécie *Cunninghamella* sp. não foi afetada pelo iodoquinol. A auranofina não foi capaz de alterar lipídeos das três espécies testadas (**Figura 16C**).



**Figura 16:** O efeito da auranofina e iodoquinol em células de *R. oryzae*, *M. velutinosus* e *Cunninghamella* sp. foi analisado pelo uso de marcadores fluorescentes. As células foram crescidas na presença de ½ MIC de cada fármaco por 48 h a 37°C. A quitina foi avaliada pela marcação com branco de Calcofluor (A). O conteúdo de manose foi avaliado pela marcação com Concanavalina A (B). Lipídios neutros foram quantificados pela marcação com Nile Red (C). RO: *R. oryzae*; Mv: *M. velutinosus*; Cu: *Cunninghamella* sp.; Ctl (-) controle negativo das células na ausência de marcadores fluorescentes. Ctl (+) controle das células marcadas, mas sem tratamento com os fármacos. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 5.6. Método “checkerboard” para análise dos efeitos combinatórios entre os fármacos com agentes antifúngicos.

Para investigar o efeito combinatório entre a auranofina e iodoquinol com outros fármacos como anfotericina B e posaconazol, foi realizada a análise pelo método *checkerboard*. A espécie *R. oryzae* foi escolhida como representante das espécies Mucorales. O somatório do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) foi empregado para avaliar os possíveis efeitos sinérgicos entre os fármacos selecionados em combinação com os antifúngicos anfotericina B e posaconazol (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Efeito combinatório entre auranofina e iodoquinol com antifúngicos convencionais anfotericina B e posaconazol em espécies de *R. oryzae*.

	MIC <sub>50</sub> sozinho (µM)	MIC combinado (µM)		FICI
Auranofina	10	Auranofina/Posaconazol	5/0,625	0,75 (aditivo)
Iodoquinol	10	Auranofina/Anfotericina B	5 / 0,625	1 (sem efeito)
Posaconazol	2,5	Iodoquinol/Posaconazol	10/2,5	2 (sem efeito)
Anfotericina B	1,25	Iodoquinol/Anfotericina B	2,5/0,31	0,5 (aditivo)

Além disso, a interação entre esses fármacos também foi avaliada pelo método de independência Bliss (**Tabela 3**). A auranofina apresentou interação sinérgica com o posaconazol e antagônica com a anfotericina B. Já o iodoquinol apresentou efeito sinérgico com a anfotericina B e antagônico com o posaconazol.

**Tabela 3:** Atividade antifúngica da auranofina, iodoquinol, posaconazol e anfotericina B – sozinhas ou em combinação, de acordo com o método de independência Bliss.

	Eficácia do fármaco combinado							
	Eficácia do fármaco sozinho (% de inibição)		Anfotericina B			Posaconazol		
	MIC <sub>50</sub>	$\frac{1}{2}$ MIC <sub>50</sub>	<i>E</i> <sub>obs</sub>	<i>E</i> <sub>exp</sub>	$\Delta E$ , % (interação)	<i>E</i> <sub>obs</sub>	<i>E</i> <sub>exp</sub>	$\Delta E$ , % (interação)
Auranofina	84,5	3,05	86	97	-11(A)	41,70	36	5,7(S)
Iodoquinol	53,41	37,5	86	59	27(S)	65	67	-2(A)
Anfotericina B	86,2	14,64	NR	NR	NR	NR	NR	NR

---

Posaconazol	79,92	41,19	NR	NR	NR	NR	NR	NR
-------------	-------	-------	----	----	----	----	----	----

---

## 6. DISCUSSÃO.

Infecções causadas por espécies de Mucorales tem aumentado nas últimas décadas, destacando esses patógenos como oportunistas emergentes. Essas infecções acometem pacientes imunocomprometidos e/ou pacientes com doenças subjacentes, principalmente aqueles que apresentam diabetes sendo o maior grupo com maior risco de infecção (Chamilos e Garre, 2024). A taxa de mortalidade excede aos 40% e pode chegar a 100% com a forma disseminada da doença (Chamilos e Garre, 2024). No entanto, também podem acometer pacientes imunocompetentes, normalmente através de traumas ou queimaduras, o que permite a entrada desses patógenos no tecido hospedeiro. Os gêneros que se destacam pela alta incidência de mucormicose são os gêneros *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. e *Lichteimia* spp., sendo *R. oryzae* a espécie mais prevalente (Skiada, Pavleas e Drogari-Apiranthitou, 2020). O tratamento para mucormicose é agressivo e com baixa taxa de sucesso, sendo necessário desbridamento cirúrgico combinado com terapia antifúngica. No entanto, no cenário clínico apenas a anfotericina B é eficaz contra a maioria das espécies fúngicas e o perfil de susceptibilidade aos fármacos utilizados na clínica varia dependendo da espécie. Portanto torna-se necessária a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antifúngica para o tratamento de mucormicose (Liang *et al.*, 2024).

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia promissora para aumentar o arsenal terapêutico contra infecções, principalmente infecções que são negligenciadas. A auranofina é um fármaco aprovado pela FDA para o tratamento de artrite reumatóide e o seu mecanismo de ação é baseado na inibição da enzima tiorredoxina redutase. Atualmente sabe-se que a auranofina tem demonstrado atividade antimicrobiana, antiparasitária, antiviral e anticancerígena. Atualmente a auranofina está em ensaio clínico de fase 1 para o tratamento de parasitas como *Entamoeba histolytica* e *Giardia intestinalis* (Capparelli *et al.*, 2017). O iodoquinol é um fármaco aprovado pela FDA para o tratamento de amebíase, com mecanismo de ação baseado na quelação de íons

metálicos, além de apresentar promissora atividade antibacteriana, antifúngica, e também contra o vírus Sars-CoV-2 (Shahabadi *et al.*, 2021).

Neste trabalho, descrevemos a atividade antifúngica da auranofina e do iodoquinol contra agentes causadores da mucormicose. A auranofina apresentou MIC<sub>70</sub> de 20 µM e efeito fungistático, corroborando com outros estudos que reportaram atividade antifúngica da auranofina contra a *R. oryzae* (Wiederhold *et al.*, 2017). Ao contrário das observações feitas com outras espécies fúngicas, como *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum* e *Lomentospora prolificans* que apresentaram MICs variando de 1.25 µM - 16 µM (Wiederhold *et al.*, 2017; Rollin-Pinheiro, 2021). Isso sugere que as espécies de Mucorales necessitam de concentrações maiores para a inibição de 50 – 70% do crescimento fúngico. Em relação à concentração mínima fungicida descrita na literatura, a auranofina apresentou efeito fungicida para em espécies de *Aspergillus spp.*, *Candida albicans* e efeito fungistático para *Cryptococcus neoformans* (Fuchs *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2023).

O iodoquinol apresentou melhores resultados atingindo MIC<sub>70</sub> com valores na faixa 20 µM para as espécies de *R. oryzae* e *Cunninghamella sp.* e efeito fungicida somente para a espécie de *R. oryzae* na concentração de 40 µM. Já foi relatado que o iodoquinol demonstrou atividade antifúngica contra fungos do gênero *Sporothrix*, *Phialophora*, *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Candida*, *Scedosporium* e *Lomentospora*, com concentrações variando entre 5 µM – 20 µM (Wall, Herrera e Lopez-Ribot, 2019), e com valores de MFC entre 1 µM – 16 µM para espécie *P. verrucosa* e *F. monophora*. No entanto, para espécies como *C. carrionii*, *E. dermatitidis*, *E. jeanselmei*, *F. pedrosoi*, *F. nubica* e *R. similis* o efeito fungistático foi observado na faixa de concentração de 1,24 a 2,5µM (Coelho *et al.*, 2020). Neste trabalho, a auranofina e o iodoquinol afetaram o crescimento das três espécies testadas como observado na cinética (**Figura 9**). Portanto, os resultados de susceptibilidade obtidos neste trabalho estão de acordo com o observado na literatura para auranofina e iodoquinol, demonstrando potencial atividade antifúngica entre as espécies de Mucorales e também variando esse potencial entre os diferentes gêneros.

A citotoxicidade da auranofina e do iodoquinol é um fator crucial para a utilização desses medicamentos na clínica. Análises *in vitro* demonstraram que a citotoxicidade da

auranofina varia dependendo do modelo celular testado, variando de 0,15  $\mu\text{M}$  a 6,38  $\mu\text{M}$  (Rollin-Pinheiro et al., 2021). Pesquisas demonstram que modificações na porção de açúcar da molécula podem reduzir sua toxicidade em células de mamíferos e aumentar sua atividade em *Helicobacter pylori*. (Epstein et al., 2019). No entanto a auranofina é um fármaco utilizado em tratamento de artrite reumatóide, sendo importante levar em consideração as observações em ensaios clínicos. Nesse contexto a auranofina é segura para utilização humana com efeitos colaterais toleráveis como problemas gastrointestinais, como a diarreia e também não apresenta toxicidade cumulativa em pacientes que foram tratados com a auranofina durante cinco anos (Rollin-Pinheiro et al., 2021; Liu et al., 2022). Capparelli e colaboradores conduziram um ensaio clínico de fase 1 para o tratamento parasitário. Quinze pacientes foram selecionados para esse estudo sendo treze homens e duas mulheres, com idade média de 27 anos. Os pacientes consumiram a auranofina por sete dias de forma oral e foram analisados por 126 dias. De acordo com esse estudo, a auranofina foi bem tolerada e apenas 46% dos pacientes apresentaram efeitos adversos leves. Além disso, a pesquisa demonstrou acúmulo de ouro no plasma e nas fezes dos pacientes no 1º e 7º dia de tratamento com auranofina. No sétimo dia, foi observada a excreção de 64% do ouro nas fezes. Os resultados sugerem que a auranofina pode ser segura para o tratamento antiparasitário (Capparelli et al., 2017).

A citotoxicidade do iodoquinol *in vitro* já foi relatada com variação de 2,5  $\mu\text{M}$  a 125  $\mu\text{M}$  (Rollin-Pinheiro et al., 2021). O iodoquinol apresenta uma má absorção intestinal, além de diversos efeitos colaterais como no sistema nervoso central como convulsões, encefalopatia e danos oculares como atrofia óptica levando à cegueira irreversível, o que limita a sua utilização para tratamento sistêmico, o que levou a Academia Americana de Pediatria proibir o seu uso em crianças. (Kauffman, Banner e Blumer, 1990; Fisher, Walter e Steven, 1993). Kamel e colaboradores conduziram um estudo em camundongos o qual investigou seus efeitos colaterais. Neste estudo foi observado que camundongos do gênero feminino apresentaram maior vulnerabilidade aos efeitos neurotóxicos exibindo anormalidades sensoriais e disfunções motoras. O trabalho destacou a importância de considerar a idade e o sexo como fatores de suscetibilidade à neurotoxicidade induzida pelo iodoquinol (Kamel et al., 2022). Apesar desses problemas, cremes de uso tópico são utilizados para tratamento de infecções bacterianas e fúngicas da pele. Além disso, fármacos da classe 8-hidroxiquinolinas incluindo iodoquinol são

amplamente utilizados atualmente para a síntese de novos compostos mais efetivos com menos efeitos colaterais (Wall, Herrera e Lopez-Ribot, 2019; Chaaban *et al.*, 2021).

O biofilme de espécies de Mucorales é uma estrutura robusta, altamente resistente e apresenta uma matriz extracelular composta principalmente por glucosamina (GlcN) e *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) (Singh, Shivaprakash e Chakrabarti, 2011; Xisto *et al.*, 2023). O biofilme está associado a diversas infecções como peritonite, osteomielite e formação de bola fúngica dos seios paranasais, além de também estar associado a inoculação por catéteres. A presença do biofilme limita o tratamento de mucormicose, visto que as células que o compõem são altamente resistentes aos antifúngicos tradicionais, principalmente quando comparado com as células planctônicas. Além disso, infecções associadas a biofilmes apresentam pior prognóstico sendo, portanto, de extrema importância a busca por fármacos com a capacidade de inibir o biofilme (Singh, Shivaprakash e Chakrabarti, 2011). O presente estudo analisou a eficácia da auranofina e do iodoquinol frente ao biofilme pré-formado de três espécies de Mucorales. De acordo com a **Figura 10** a auranofina apresentou a capacidade de reduzir significativamente a biomassa, matriz e a viabilidade do biofilme nas três espécies testadas. Ao analisar a morfologia das células na estrutura do biofilme pré-formado na **Figura 11** é possível observar alterações celulares nas três espécies testadas, em especial na espécie *M. velutinosus* (**Figura 11**). Esses resultados demonstram um comprometimento na estrutura do biofilme pré-formado de Mucorales com a auranofina. Tem sido descrito a atividade anti-biofilme da auranofina frente a diversos microrganismos. Em bactérias a auranofina apresentou alta capacidade de inibir o biofilme de bactérias clinicamente relevantes incluindo *Enterococcus*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (Jang e Eom, 2019; Liu *et al.*, 2021; Coscione *et al.*, 2024). Do ponto de vista fúngico a auranofina apresentou atividade anti-biofilme contra *Candida*, *Aspergillus*, *Scedosporium* e *Lomentospora* (Thangamani *et al.*, 2017; Rollin-Pinheiro, 2021; Felix *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2023). Além disso, também demonstrou uma boa atividade contra biofilmes mistos como bacteriano e fúngico em catéteres (She *et al.*, 2019; Felix *et al.*, 2023). Felix e colaboradores relataram que cateteres revestidos com auranofina apresentaram a capacidade de inibir biofilme misto de *Candida albicans* e *S. aureus* em modelos *in vitro* e *in vivo*. Além da auranofina diminuir a formação do biofilme de *Candida albicans* e *S. aureus* em implante subcutâneo murino, também diminuiu a infecção na corrente sanguínea ocasionada por catéteres (Felix *et al.*, 2023).

O iodoquinol foi capaz de inibir o biofilme das espécies de *R. oryzae* e *M. velutinosus* a partir da concentração do MIC (**Figura 12**). Já o biofilme de *Cunninghamella* sp. se mostrou mais resistente. A morfologia das células no biofilme pré-formado tratadas com 2MIC de iodoquinol foi alterada nas três espécies de Mucorales testadas (**Figura 13**). As espécies de *R. oryzae* e *Cunninghamella* sp. tratadas com iodoquinol demonstraram redução da biomassa fúngica e alterações morfológicas como hifas mais finas. *M. velutinosus* tratado com iodoquinol apresentou maior quantidade de esporos com poucas formações de hifas. O potencial anti-biofilme do iodoquinol já foi descrita na literatura para as espécies de *S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. dehoogii*, *S. aurantiacum* e *L. prolificans*, apresentando atividade moderada frente ao biofilme pré-formado desses fungos (Rollin-Pinheiro, 2021). Além disso, em outro estudo com *Candida* spp. a atividade anti-biofilme do iodoquinol também foi moderada (Wall, Herrera e Lopez-Ribot, 2019).

De maneira geral, nossos resultados demonstraram que a auranofina apresenta atividade anti-biofilme promissora para as espécies de Mucorales. A eficácia contra biofilmes pré-formados torna esse fármaco promissor tanto para o tratamento de infecções associadas a biofilmes quanto para revestimentos de catéteres. Os biofilmes pré-formados, em geral, são mais resistentes em comparação com os biofilmes em formação. A auranofina apresentou resultados satisfatórios ao afetar o biofilme, enquanto a eficácia do iodoquinol é variável dependendo da espécie e/ou gênero fúngico. O conhecimento sobre a atividade anti-biofilme do iodoquinol na literatura ainda é limitado, sendo necessário mais estudos, principalmente *in vivo* para avaliar a sua atividade. No entanto, com resultados obtidos no nesse estudo, a auranofina e o iodoquinol são fármacos promissores não apenas para inibir células planctônicas, mas também biofilme de espécies de Mucorales.

A fim de aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação dos fármacos investigados, realizamos experimentos que permitiram avaliar alterações na susceptibilidade fúngica e alterações de parâmetros celulares. Concentrações sub-inibitórias de auranofina foram capazes de aumentar moderadamente a susceptibilidade de *R. oryzae* e *M. velutinosus* aos estressores de membrana NaCl e SDS. Esses resultados demonstraram que a auranofina apresenta a capacidade de afetar lipídios essenciais que

estão presentes na membrana, afetando a sua integridade. Thangamani e colaboradores relataram que a auranofina consegue inibir parcialmente a biossíntese de lipídios de espécies de *S. aureus* (Thangamani *et al.*, 2016). No entanto, ao analisar marcadores celulares, como Nile Red, somente a espécie *R. oryzae* teve diminuição no conteúdo de lipídios neutros, enquanto na espécie *M. velutinosus*, possivelmente a auranofina afeta a integridade da membrana, mas não os lipídios neutros, já que não houve diminuição no conteúdo desses lipídeos nas células tratadas.

Analisando os efeitos da auranofina frente aos carboidratos da parede celular das espécies testadas, percebe-se que a auranofina reduz o conteúdo de quitina somente das espécies de *R. oryzae* e *M. velutinosus* e o conteúdo de manose apenas na espécie *Cunninghamella* sp. Esse conjunto de evidências sugere que a auranofina possui a capacidade de modificar componentes essenciais da parede celular fúngica. Por ser fármaco metálico, a auranofina pode afetar múltiplos alvos presente em uma célula, os quais reduzem a possibilidade do surgimento de resistência. Thangamani e colaboradores já haviam relatado que a auranofina apresenta atividade de amplo espectro em bactérias e em fungos, afetando vias de biossíntese de parede e membrana respectivamente (Thangamani *et al.*, 2016; Coscione *et al.*, 2024).

A auranofina foi capaz de aumentar a susceptibilidade das três espécies testadas à menadiona, estressor oxidativo, corroborando com o mecanismo de ação primário da auranofina em inibir a enzima tioredoxina redutases (TrxRs), o que leva as células estarem mais suscetíveis aos estresses oxidativos. Essas enzimas estão presentes em microrganismos, incluindo espécies fúngicas, as quais são essenciais para sua viabilidade (Coscione *et al.*, 2024). Diversos estudos demonstraram que a auranofina apresenta atividade sobre as enzimas TrxRs de diferentes microrganismos, incluindo *Trichomonas vaginalis* e *Aspergillus* spp. (Hopper *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2023). Além disso, a TrxRs mostrou ser essencial para a proteção contra ROS em *Saccharomyces* spp. e em espécies clinicamente relevantes como *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp. (Missal e Lodge, 2005; Chen *et al.*, 2023), demonstrando que fármacos com alvos principalmente em enzimas tiol redox são promissores para tratamento de infecções fúngicas (Thon *et al.*, 2007; da Silva Dantas *et al.*, 2010; May *et al.*, 2018). Chen e colaboradores mostraram que a auranofina apresentava capacidade de inibir a expressão e a atividade enzimática da TrxRs em espécies de *Aspergillus* spp., demonstrando que o mecanismo de ação

primário também atua em células fúngicas, principalmente em fungos filamentosos (Chen *et al.*, 2023). Além disso, já foi relatado que a adição da menadiona aumenta a susceptibilidade a auranofina em espécies de *Scedosporium* spp. e *Lomentospora prolificans* (Yaakoub *et al.*, 2021). Portanto nossos resultados demonstraram que a auranofina apresenta como alvo, em espécies de Mucorales, importantes estruturas para a célula fúngica incluindo membrana, parede celular e enzimas essenciais como o TxRs.

O iodoquinol foi capaz de aumentar a susceptibilidade das espécies de *R. oryzae* e *M. velutinosus* ao SDS e NaCl, sendo a espécie de *R. oryzae* a mais afetada. O iodoquinol foi capaz de reduzir o conteúdo lipídico das espécies de *R. oryzae* e *M. velutinosus*. Essas observações demonstram que a membrana celular fúngica de Mucorales é um possível alvo para o iodoquinol. Há poucos relatos na literatura sobre as alterações celulares causadas pelo iodoquinol. Espécies de *Sporotrix* spp tratadas com iodoquinol apresentaram ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular (Borba-Santos e Rozental, 2020). Pippi e colaboradores mostraram resultados sobre o mecanismo de ação antifúngica de derivados da 8-hidroxiquinolina frente às espécies de *Candida* spp. e fungos dermatófitos, O iodoquinol atua na parede celular de espécies de *Candida* e inibe o crescimento de pseudohifas, enquanto outros derivados (ácido 8-hidroxi-5-quinolinesulfônico e ácido 8-hidroxi-7-iodo-5-quinolinesulfônico) comprometem a integridade e a permeabilidade da membrana plasmática fúngica de espécies de *Candida* spp. e dermatófitos (Pippi *et al.*, 2019.). Isto demonstra que derivados da 8-hidroxiquinolina, incluindo o iodoquinol podem apresentar diferentes alvos fúngicos, sugerindo que seus derivados apresentam um amplo espectro de ação e são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades antifúngicas. (Pippi *et al.* 2019).

A terapia combinada é uma estratégia interessante para evitar o aparecimento de resistência e melhorar o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. No presente estudo foi analisada a eficácia da auranofina e do iodoquinol combinados com fármacos convencionais para o tratamento de mucormicose como anfotericina B e posaconazol na espécie *R. oryzae*. A análise FICI revelou que as seguintes combinações, auranofina com posaconazol e iodoquinol com anfotericina B foram aditivas contra a espécies de *R. oryzae*, não apresentando efeito em outras combinações. O método de independência Bliss é um cálculo que avalia a probabilidade das interações do medicamento, o qual é

um método utilizado para definir se as interações dos fármacos são sinérgicas ou antagônicas (Rollin-Pinheiro, 2021), e por esse método de análise os dados revelaram que a auranofina apresenta efeito sinérgico com o posaconazol e efeito antagônico com a anfotericina B, enquanto o iodoquinol apresenta sinergismo com a anfotericina B e antagonismo com o posaconazol. Esses dados sugerem que a definição de sinergia é controversa e pode variar de acordo com a metodologia utilizada, sendo necessário mais estudos para esclarecer as interações entre a auranofina e iodoquinol com agentes antifúngicos atualmente utilizados na clínica.

## **8. CONCLUSÃO.**

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a Auranofina e o iodoquinol, apresentam atividade antifúngica promissora contra as três espécies testadas em células platinicas e biofilme, além disso pode concluir que a Auranofina e o iodoquinol apresenta diversas moléculas alvos, incluindo açúcares presente na parede e lipídios, demonstrando uma atividade de amplo espectro. Foi analisada o efeito combinatório da auranofina e do iodoquinol combinados com fármacos que já são utilizados na clínica como a anfotericina B e o posaconazol. Foi demonstrado que auranofina combinado com o posaconazol e o iodoquinol combinado com anfotericina B apresentaram maior atividade antifúngica em relação aos fármacos sozinhos.

## 7. REFERÊNCIAS.

- Abd El-Baky, R. M., Shady, E. R., Yahia, R., Ahmed, F. Y., Ramadan, M., Ahmed, H. R., ... & Hetta, H. F. (2023). COVID-19 associated Mucormycosis among ICU patients: risk factors, control, and challenges. *AMB Express*, *13*(1), 99.
- Abdalbari, F. H., & Telleria, C. M. (2021). The gold complex auranofin: new perspectives for cancer therapy. *Discover Oncology*, *12*(1), 42.
- Abutaleb, N. S., & Seleem, M. N. (2020). Auranofin, at clinically achievable dose, protects mice and prevents recurrence from *Clostridioides difficile* infection. *Scientific reports*, *10*(1), 7701.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2021). Orientações para vigilância, identificação, prevenção e controle de infecções fúngicas invasivas em serviços de saúde no contexto da pandemia da COVID-19 (Nota Técnica nº 04/2021, pp. 1-39).
- Ahmadi, A., Mohammadnejadi, E., Karami, P., & Razzaghi-Asl, N. (2022). Current status and structure activity relationship of privileged azoles as antifungal agents (2016–2020). *International Journal of Antimicrobial Agents*, *59*(3), 106518.
- Almyroudi, M. P., Akinosoglou, K., Rello, J., Blot, S., & Dimopoulos, G. (2022). Clinical phenotypes of COVID-19 associated mucormycosis (CAM): a comprehensive review. *Diagnostics*, *12*(12), 3092.
- Alqarihi, A., Kontoyiannis, D. P., & Ibrahim, A. S. (2023). Mucormycosis in 2023: An update on pathogenesis and management. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1254919.
- Anchundia, M., León-Revelo, G., Santacruz, S., & Torres, F. (2024). Polyphasic identification of *Rhizopus oryzae* and evaluation of physical fermentation parameters in potato starch processing liquid waste for  $\beta$ -glucan production. *Scientific Reports*, *14*(1), 14913.
- Azhar, A., Khan, W. H., Khan, P. A., Alhosaini, K., Owais, M., & Ahmad, A. (2022). Mucormycosis and COVID-19 pandemic: Clinical and diagnostic approach. *Journal of Infection and Public Health*, *15*(4), 466-479.
- Bala, K., Chander, J., Handa, U., Punia, R. S., & Attri, A. K. (2015). A prospective study of mucormycosis in north India: experience from a tertiary care hospital. *Medical Mycology*, *53*(3), 248-257.
- Baldin, C., & Ibrahim, A. S. (2017). Molecular mechanisms of mucormycosis—The bitter and the sweet. *PLoS pathogens*, *13*(8), e1006408.
- Bao, J., Liu, C., Dong, Y., Xu, Y., Wang, Z., Sun, K., ... & Gao, Z. (2022). Clinical manifestations of pulmonary mucormycosis in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a 21-case series report and literature review. *Canadian Respiratory Journal*, 2022
- Bartnicki-Garcia, S., & Reyes, E. (1968). Chemical composition of sporangiophore walls of *Mucor rouxii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *165*(1), 32-42.
- Beaver, R., Garza, B., Vallabhaneni, H., Cahuayme-Zuniga, L., Midturi, J., & LaDow, T. (2021). Use of topical amphotericin in a case of refractory sino-orbital angioinvasive mucormycosis. *Medical Mycology Case Reports*, *33*, 21-25.
- Benedict, K., & Park, B. J. (2014). Invasive fungal infections after natural disasters. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(3), 349.
- Binder, U., Maurer, E., & Lass-Flörl, C. (2014). Mucormycosis—from the pathogens to the disease. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*, 60-66.

- Borba-Santos, L. P., Vila, T., & Rozental, S. (2020). Identification of two potential inhibitors of *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* in the Pathogen Box collection. *PLoS One*, *15*(10), e0240658.
- Brilhante, R. S. N., Araújo, G. D. S., Fonseca, X. M. Q. C., Guedes, G. M. M., Aguiar, L., Castelo-Branco, D. S. C. M., Cordeiro, R. A., Sidrim, J. J. C., Pereira Neto, W. A., & Rocha, M. F. G. (2020). Antifungal effect of anthraquinones against *Cryptococcus neoformans*: detection of synergism with amphotericin B. *Medical Mycology*, *59*, 564-570.
- Butts, A., Palmer, G. E., & Rogers, P. D. (2017). Antifungal adjuvants: Preserving and extending the antifungal arsenal. *Virulence*, *8*(2), 198-210
- Capparelli, E. V., Bricker-Ford, R., Rogers, M. J., McKerrow, J. H., & Reed, S. L. (2017). Phase I clinical trial results of auranofin, a novel antiparasitic agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(1), 10-1128.
- Cavassin, F. B., Baú-Carneiro, J. L., Vilas-Boas, R. R., & Queiroz-Telles, F. (2021). Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. *Infectious Diseases and Therapy*, *10*(1), 115-147.
- Chaaban, I., Hafez, H., AlZaim, I., Tannous, C., Ragab, H., Hazzaa, A., Ketat, S., Ghoneim, A., Katary, M., Abd-Alhaseeb, M., Zouein, F., Albohy, A., Amer, A., El-Yazbi, A., & Belal, A. (2021). Transforming iodoquinol into broad spectrum anti-tumor leads: Repurposing to modulate redox homeostasis.. *Bioorganic Chemistry*, *113*, 105035 . <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105035>.
- Chamilos, G., & Garre, V. (2024). Advancements in the understanding of Mucorales biology and the management of mucormycosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*, 1427252.
- Chen, P., Yang, J., Jin, Y., Lu, C., Feng, Z., Gao, F., ... & Lin, W. (2023). In vitro antifungal and antibiofilm activities of auranofin against itraconazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Mycology*, *33*(2), 101381.
- Coelho, R. A., Joffe, L. S., Alves, G. M., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Brito-Santos, F., Amaral, A. C. F., ... & Almeida-Paes, R. (2020). A screening of the MMV Pathogen Box® reveals new potential antifungal drugs against the etiologic agents of chromoblastomycosis. *PLoS One*, *15*(5), e0229630.
- Cornely, O. A., Alastruey-Izquierdo, A., Arenz, D., Chen, S. C., Dannaoui, E., Hochhegger, B., ... & Chakrabarti, A. (2019). Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(12), e405-e421.
- Cortés, J. C. G., Curto, M. Á., Carvalho, V. S., Pérez, P., & Ribas, J. C. (2019). The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnology advances*, *37*(6), 107352.
- Coscione, F., Zineddu, S., Vitali, V., Fondi, M., Messori, L., & Perrin, E. (2024). The Many Lives of Auranofin: How an Old Anti-Rheumatic Agent May Become a Promising Antimicrobial Drug. *Antibiotics*, *13*(7), 652.
- Costa-Orlandi, C. B., Sardi, J. C., Pitanguí, N. S., De Oliveira, H. C., Scorzoni, L., Galeane, M. C., ... & Mendes-Giannini, M. J. S. (2017). Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *Journal of Fungi*, *3*(2), 22.
- Dam, P., Cardoso, M. H., Mandal, S., Franco, O. L., Sağıroğlu, P., Polat, O. A., ... & Ocsoy, I. (2023). Surge of mucormycosis during the COVID-19 pandemic. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *52*, 102557.

- Dannaoui, E. (2022). Recent developments in the diagnosis of mucormycosis. *Journal of Fungi*, 8(5), 457.
- Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*, 362(9390), 1142-1151.
- Dogra, S., Arora, A., Aggarwal, A., Passi, G., Sharma, A., Singh, G., & Barnwal, R. P. (2022). Mucormycosis amid COVID-19 crisis: pathogenesis, diagnosis, and novel treatment strategies to combat the spread. *Frontiers in Microbiology*, 12, 794176.
- Donnelly, J. P., & De Pauw, B. E. (2004). Voriconazole—a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 107-117.
- Douglas, L. M., & Konopka, J. B. (2016). Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Journal of Microbiology*, 54, 178-191.
- Dunay, I. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., & Montoya, J. G. (2018). Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 10-1128.
- Epstein, T. D., Wu, B., Moulton, K. D., Yan, M., & Dube, D. H. (2019). Sugar-modified analogs of auranofin are potent inhibitors of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *ACS Infectious Diseases*, 5(10), 1682-1687.
- Farias, L. A. B. G., Damasceno, L. S., Bandeira, S. P., Barreto, F. K. D. A., Leitão, T. D. M. J. S., & Cavalcanti, L. P. D. G. (2021). COVID-19 associated Mucormycosis (CAM): Should Brazil be on alert?. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54, e0410-2021.
- Felix, L., Whitely, C., Tharmalingam, N., Mishra, B., Vera-Gonzalez, N., Mylonakis, E., ... & Fuchs, B. B. (2023). Auranofin coated catheters inhibit bacterial and fungal biofilms in a murine subcutaneous model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1135942.
- Fisher, A. K., Walter, F. G., & Szabo, S. (1993). Iodoquinol associated seizures and radiopacity. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 31(1), 113-120. fungi. *Virulence*, 15, 2299183.
- Ganesan, P., Ganapathy, D., Sekaran, S., Murthykumar, K., Sundramoorthy, A. K., Pitchiah, S., & Shanmugam, R. (2022). Molecular mechanisms of antifungal resistance in mucormycosis. *BioMed Research International*, 2022(1), 6722245.
- Gebremariam, T., Gu, Y., Singh, S., Kitt, T. M., & Ibrahim, A. S. (2021). Combination treatment of liposomal amphotericin B and isavuconazole is synergistic in treating experimental mucormycosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(10), 2636-2639.
- Ghuman, H., & Voelz, K. (2017). Innate and adaptive immunity to mucorales. *Journal of Fungi*, 3(3), 48.
- Gow, N. A., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 10-1128.
- Groll, A. H., Desai, A., Han, D., Howieson, C., Kato, K., Akhtar, S., ... & Townsend, R. (2017). Pharmacokinetic assessment of drug-drug interactions of isavuconazole with the immunosuppressants cyclosporine, mycophenolic acid, prednisolone, sirolimus, and tacrolimus in healthy adults. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 6(1), 76-85.
- Gupta, I., Baranwal, P., Singh, G., & Gupta, V. (2023). Mucormycosis, past and present: a comprehensive review. *Future Microbiology*, 18(3), 217-234.
- Gupta, R., Luxami, V., & Paul, K. (2021). Insights of 8-hydroxyquinolines: A novel target in medicinal chemistry. *Bioorganic Chemistry*, 108, 104633.

- Harada, M., Yasuda, K., Uruchida, K., Yamashita, R., Morikawa, K., Ito, Y., ... & Koshimizu, N. (2023). An autopsy case of disseminated *Cunninghamella bertholletiae* infection in an immunocompetent patient: a case report. *BMC Pulmonary Medicine*, 23(1), 88.
- Harding, M. W., Marques, L. L., Howard, R. J., & Olson, M. E. (2009). Can filamentous fungi form biofilms ?. *Trends in Microbiology*, 17(11), 475-480.
- Hatinguais, R., Willment, J. A., & Brown, G. D. (2020). PAMPs of the fungal cell wall and mammalian PRRs. *The Fungal Cell Wall: An Armour and a Weapon for Human Fungal Pathogens*, 187-223.
- Herrera e Lopez-Ribot, J. L. (2019). Repositionable compounds with antifungal activity against multidrug resistant *Candida auris* identified in the medicines for malaria venture's pathogen box. *Journal of Fungi*, 5(4), 92.
- Hopper, M., Yun, J. F., Zhou, B., Le, C., Kehoe, K., Le, R., ... & Wrischnik, L. A. (2016). Auranofin inactivates *Trichomonas vaginalis* thioredoxin reductase and is effective against trichomonads in vitro and in vivo. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6), 690-694.
- Hussain, M. K., Ahmed, S., Khan, A., Siddiqui, A. J., Khatoon, S., & Jahan, S. (2023). Mucormycosis: A hidden mystery of fungal infection, possible diagnosis, treatment and development of new therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 246, 115010.
- Ibrahim, A. S. (2014). Host-iron assimilation: pathogenesis and novel therapies of mucormycosis. *Mycoses*, 57, 13-17.
- Ibrahim, A. S., Gebremariam, T., Fu, Y., Edwards Jr, J. E., & Spellberg, B. (2008). Combination echinocandin-polyene treatment of murine mucormycosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1556-1558.
- Ibrahim, A. S., Spellberg, B., & Edwards Jr, J. (2008). Iron acquisition: a novel perspective on mucormycosis pathogenesis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(6), 620-625.
- Ibrahim, Ashraf S., et al. "Pathogenesis of mucormycosis." *Clinical Infectious Diseases* 54.suppl\_1 (2012): S16-S22.
- Íñigo, M., & Del Pozo, J. L. (2018). Fungal biofilms: From bench to bedside. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(Suppl 1), 35.
- Jang, H. I., & Eom, Y. B. (2019). Repurposing auranofin to combat uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 459-471.
- Johnson, M. D. (2021). Antifungals in clinical use and the pipeline. *Infectious Disease Clinics*, 35(2), 341-371.
- Johnson, M. D., & Perfect, J. R. (2010). Use of antifungal combination therapy: agents, order, and timing. *Current Fungal Infection Reports*, 4, 87-95.
- Joichi, Y., Chijimatsu, I., Yarita, K., Kamei, K., Miki, M., Onodera, M., ... & Ohge, H. (2014). Detection of *Mucor velutinosus* in a blood culture after autologous peripheral blood stem cell transplantation: a pediatric case report. *Medical Mycology Journal*, 55(2), E43-E48.
- JW, P. (2005). Evaluation of (1-> 3)- $\beta$ -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infection. *J Clin Microbiol*, 43, 5957-5962.
- Kamel, A. S., Mohamed, A. F., Rabie, M. A., Elsherbiny, M. E., Ahmed, K. A., Khattab, M. M., & Abdelkader, N. F. (2022). Experimental evidence for diiodohydroxyquinoline-induced neurotoxicity: characterization of age and gender as predisposing factors. *Pharmaceuticals*, 15(2), 251.

- Kamiński, D. M. (2014). Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *European Biophysics Journal*, 43, 453-467.
- Katragkou, A., Walsh, T. J., & Roilides, E. (2014). Why is mucormycosis more difficult to cure than more common mycoses?. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 74-81.
- Kauffman, R. E., Banner, J. W., & Blumer, J. L. (1990). Clioquinol (Idochlorhydroxyquin, Vioform) and Iodoquinol (Diiodohydroxyquin): Blindness and Neuropathy. *Pediatrics*, 86(5), 797-798.
- Khanna, M., Challa, S., Kabeil, A. S., Inyang, B., Gondal, F. J., Abah, G. A., ... & dhandapani Jr, M. M. (2021). Risk of mucormycosis in Diabetes Mellitus: a systematic review. *Cureus*, 13(10).
- Kontoyiannis, D. P., & Lewis, R. E. (2011). How I treat mucormycosis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(5), 1216-1224.
- Kottarathil, M., Thayanidhi, P., Sathyamurthy, P., & Kindo, A. J. (2023). Rise of mucormycosis during the COVID-19 pandemic and the challenges faced. *Current Medical Mycology*, 9(1), 44.
- Kovanda, L. L., Maher, R., & Hope, W. W. (2016). Isavuconazonium sulfate: a new agent for the treatment of invasive aspergillosis and invasive mucormycosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(7), 887-897.
- Lackner, N., Posch, W., & Lass-Flörl, C. (2021). Microbiological and molecular diagnosis of mucormycosis: from old to new. *Microorganisms*, 9(7), 1518.
- Lamaris, G. A., Ben-Ami, R., Lewis, R. E., Chamilos, G., Samonis, G., & Kontoyiannis, D. P. (2009). Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(9), 1399-1406.
- Latgé, J. P., Beauvais, A., & Chamilos, G. (2017). The cell wall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: biosynthesis, organization, immune response, and virulence. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 99-116.
- Leifer, W., & Steiner, K (1950). Diiodohydroxyquinoline in dermatologic therapy. *Archives of Dermatology and Syphilology*, 62(1), 46-53.
- Levitz, S. M., Selsted, M. E., Ganz, T., Lehrer, R. I., & Diamond, R. D. (1986). In vitro killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, 154(3), 483-489.
- Liang, M., Xu, J., Luo, Y., & Qu, J. (2024). Epidemiology, pathogenesis, clinical characteristics, and treatment of mucormycosis: a review. *Annals of Medicine*, 56(1), 2396570.
- Lin, J., Xiao, X., Liang, Y., Zhao, H., Yu, Y., Yuan, P., ... & Ding, X. (2022). Repurposing non-antifungal drugs auranofin and pentamidine in combination as fungistatic antifungal agents against *C. albicans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1065962.
- Lionakis, M. S., & Kontoyiannis, D. P. (2003). Glucocorticoids and invasive fungal infections. *The Lancet*, 362(9398), 1828-1838.
- Liu, H., Shukla, S., Vera-González, N., Tharmalingam, N., Mylonakis, E., Fuchs, B. B., & Shukla, A. (2019). Auranofin releasing antibacterial and antibiofilm polyurethane intravascular catheter coatings. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 37.
- Liu, M., Spellberg, B., Phan, Q. T., Fu, Y., Fu, Y., Lee, A. S., ... & Ibrahim, A. S. (2010). The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1914-1924.



- Peyclit, L., Yousfi, H., Rolain, J. M., & Bittar, F. (2021). Drug repurposing in medical mycology: Identification of compounds as potential antifungals to overcome the emergence of multidrug-resistant fungi. *Pharmaceuticals*, *14*(5), 488.
- Pippi, B., Lopes, W., Reginatto, P., Silva, F. É. K., Joaquim, A. R., Alves, R. J., ... & Fuentefria, A. M. (2019). New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *27*(1), 41-48.
- Pippi, B., Reginatto, P., Machado, G. D. R. M., Bergamo, V. Z., Lana, D. F. D., Teixeira, M. L., ... & Fuentefria, A. M. (2017). Evaluation of 8-hydroxyquinoline derivatives as hits for antifungal drug design. *Medical Mycology*, *55*(7), 763-773.
- Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2013). 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Design, Development and Therapy*, 1157-1178.
- Prajapati, V., Awasthi, K., Yadav, T., Rai, M., Srivastava, O., & Sundar, S. (2012). An oral formulation of amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes is an effective treatment for experimental visceral leishmaniasis.. *The Journal of Infectious Diseases*, *205* 2, 333-6 .
- Prakash, H., Singh, S., Rudramurthy, S. M., Singh, P., Mehta, N., Shaw, D., & Ghosh, A. K. (2020). An aero mycological analysis of Mucormycetes in indoor and outdoor environments of northern India. *Medical Mycology*, *58*(1), 118-123.
- Radotra, Bishan, and Sundaram Challa. "Pathogenesis and pathology of COVID-associated Mucormycosis: what is new and why." *Current Fungal Infection Reports* 16.4 (2022): 206-220.
- Ramani, R., Gromadzki, S., Pincus, D. H., Salkin, I. F., & Chaturvedi, V. (1998). Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(11), 3396-3398.
- Rammaert, B., Lanternier, F., Zahar, J. R., Dannaoui, E., Bougnoux, M. E., Lecuit, M., & Lortholary, O. (2012). Healthcare-associated mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*, *54*(suppl\_1), S44-S54.
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-18.
- Rella, A., Farnoud, A., & Poeta, M. (2016). Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence.. *Progress in Lipid Research*, *61*, 63-72 . <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.003>.
- Riad, A., Shabaan, A. A., Issa, J., Ibrahim, S., Amer, H., Mansy, Y., ... & Attia, S. (2021). COVID-19-associated mucormycosis (CAM): case-series and global analysis of mortality risk factors. *Journal of Fungi*, *7*(10), 837
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, *31*(7), 603-632.
- Roilides, E., Kontoyiannis, D. P., & Walsh, T. J. (2012). Host defenses against zygomycetes. *Clinical Infectious Diseases*, *54*(suppl\_1), S61-S66.
- Rollin-Pinheiro, R., Almeida, Y. D. C., Rochetti, V. P., Xisto, M. I. D. D. S., Borba-Santos, L. P., Rozental, S., & Barreto-Bergter, E. (2021). Miltefosine against *Scedosporium* and *Lomentospora* species: Antifungal activity and its effects on fungal cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 698662.
- Rollin-Pinheiro, R., Borba-Santos, L. P., da Silva Xisto, M. I. D., de Castro-Almeida, Y., Rochetti, V. P., Rozental, S., & Barreto-Bergter, E. (2021). Identification of Promising Antifungal Drugs against

- Scedosporium* and *Lomentospora* Species after Screening of Pathogen Box Library. *Journal of Fungi*, 7(10), 803.
- Rollin-Pinheiro, R., Rochetti, V. P., Xisto, M. I. D. D. S., Liporagi-Lopes, L. C., Bastos, B., Rella, A., ... & Barreto-Bergter, E. (2019). Sphingolipid biosynthetic pathway is crucial for growth, biofilm formation and membrane integrity of *Scedosporium boydii*. *Future Medicinal Chemistry*, 11(22), 2905-2917.
- Saadeh, H. A., Sweidan, K. A., & Mubarak, M. S. (2020). Recent advances in the synthesis and biological activity of 8-hydroxyquinolines. *Molecules*, 25(18), 4321.
- Saccoccia, F., Angelucci, F., Boumis, G., Carotti, D., Desiato, G., E Miele, A., & Bellelli, A. (2014). Thioredoxin reductase and its inhibitors. *Current Protein and Peptide Science*, 15(6), 621-646.
- Salmanton-Garcia, J., Seidel, D., Koehler, P., Mellinshoff, S. C., Herbrecht, R., Klimko, N., ... & Vehreschild, M. J. (2019). Matched-paired analysis of patients treated for invasive mucormycosis: standard treatment versus posaconazole new formulations (MoveOn). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(11), 3315-3327.
- Samby, K., Besson, D., Dutta, A., Patra, B., Doy, A., Glossop, P., ... & Willis, P. A. (2022). The pandemic response Box— Accelerating drug discovery efforts after disease outbreaks. *ACS Infectious Diseases*, 8(4), 713-720.
- Schrödl, W., Heydel, T., Schwartz, V. U., Hoffmann, K., Große-Herrenthey, A., Walther, G., ... & Voigt, K. (2012). Direct analysis and identification of pathogenic *Lichtheimia* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight analyzer-mediated mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 419-427.
- Schwarz, P., Lortholary, O., Dromer, F., & Dannaoui, E. (2007). Carbon assimilation profiles as a tool for identification of zygomycetes. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), 1433-1439.
- Shadrivova, O. V., Burygina, E. V., & Klimko, N. N. (2019). Molecular diagnostics of mucormycosis in hematological patients: a literature review. *Journal of Fungi*, 5(4), 112.
- Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., & Foroumadi, A. (2020). History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry*, 104, 104240.
- Shahabadi, N., Zendehecheshm, S., Mahdavi, M., & Khademi, F. (2021). Inhibitory activity of FDA-approved drugs cetilistat, abiraterone, diiodohydroxyquinoline, bexarotene, remdesivir, and hydroxychloroquine on COVID-19 main protease and human ACE2 receptor: a comparative in silico approach. *Informatics in Medicine Unlocked*, 26, 100745.
- Sharifpour, A., Gholinejad-Ghadi, N., Ghasemian, R., Seifi, Z., Aghili, S. R., Zaboli, E., ... & Shokohi, T. (2018). Voriconazole associated mucormycosis in a patient with relapsed acute lymphoblastic leukemia and hematopoietic stem cell transplant failure: A case report. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(3), 527-530.
- Sharma, A., & Goel, A. (2022). Mucormycosis: risk factors, diagnosis, treatments, and challenges during COVID-19 pandemic. *Folia Microbiologica*, 67(3), 363-387.
- She, P., Zhou, L., Li, S., Liu, Y., Xu, L., Chen, L., ... & Wu, Y. (2019). Synergistic microbicidal effect of auranofin and antibiotics against planktonic and biofilm-encased *S. aureus* and *E. faecalis*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2453.
- Shen, S., Shen, J., Luo, Z., Wang, F., & Min, J. (2023). Molecular mechanisms and clinical implications of the gold drug auranofin. *Coordination Chemistry Reviews*, 493, 215323.

- Shen, S., Shen, J., Luo, Z., Wang, F., & Min, J. (2023). Molecular mechanisms and clinical implications of the gold drug auranofin. *Coordination Chemistry Reviews*, 493, 215323.
- Singh, R., Shivaprakash, M. R., & Chakrabarti, A. (2011). Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiology*, 157(9), 2611-2618.
- Skiada, A., Lass-Floerl, C., Klimko, N., Ibrahim, A., Roilides, E., & Petrikkos, G. (2018). Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Medical Mycology*, 56(suppl\_1), S93-S101.
- Smith, C., & Lee, S. C. (2022). Current treatments against mucormycosis and future directions. *PLoS Pathogens*, 18(10), e1010858.
- Someshwaran, R., & Appalaraju, B. (2023). MALDI-TOF-MS for Rapid Detection of Fungi causing Mucormycosis during COVID-19 Pandemic from a Tertiary Care Hospital in Southern India: A Retrospective Cohort Study. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 17(9).
- Sonzogni-Desautels, K., & Ndao, M. (2021). Will auranofin become a golden new treatment against COVID-19?. *Frontiers in Immunology*, 12, 683694.
- Steinbrink, J. M., & Miceli, M. H. (2021). Mucormycosis. *Infectious Disease Clinics*, 35(2), 435-452.
- Sugui, J. A., Christensen, J. A., Bennett, J. E., Zelazny, A. M., & Kwon-Chung, K. J. (2011). Hematogenously disseminated skin disease caused by *Mucor velutinosus* in a patient with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Microbiology* 49(7), 2728-2732.
- Taj-Aldeen, S. J., Salah, H., Al-Hatmi, A. M., Hamed, M., Theelen, B., van Diepeningen, A. D., ... & Lass-Flörl, C. (2016). In vitro resistance of clinical *Fusarium* species to amphotericin B and voriconazole using the EUCAST antifungal susceptibility method. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(4), 438-443.
- Tanwar, M., Singh, A., Singh, T. P., Sharma, S., & Sharma, P. (2024). Comprehensive Review on the Virulence Factors and Therapeutic Strategies with the Aid of Artificial Intelligence against Mucormycosis. *ACS Infectious Diseases*.
- Thangamani, S., Maland, M., Mohammad, H., Pascuzzi, P. E., Avramova, L., Koehler, C. M., ... & Seleem, M. N. (2017). Repurposing approach identifies auranofin with broad spectrum antifungal activity that targets Mia40-Erv1 pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 4.
- Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M. F., Sobreira, T. J., Hedrick, V. E., Paul, L. N., & Seleem, M. N. (2016). Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Scientific Reports*, 6(1), 22571.
- Thielen, A., & Winkelmann, G. (1992). Rhizoferrin: a complexone type siderophore of the Mucorales and Entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiology Letters*, 94(1-2), 37-41.
- Tits, J., Cammue, B. P., & Thevissen, K. (2020). Combination therapy to treat fungal biofilm-based infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8873.
- Van Daele, R., Spriet, I., Wauters, J., Maertens, J., Mercier, T., Van Hecke, S., & Brüggemann, R. (2019). Antifungal drugs: what brings the future?. *Medical Mycology*, 57(Supplement\_3), S328-S343.
- Venkatesh, D., Dandagi, S., Chandrappa, P. R., & Hema, K. N. (2018). Mucormycosis in immunocompetent patient resulting in extensive maxillary sequestration. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 22(Suppl 1), S112-S116.
- Wall, G., Herrera, N., & Lopez-Ribot, J. L. (2019). Repositionable compounds with antifungal activity against multidrug resistant *Candida auris* identified in the medicines for malaria venture's pathogen box. *Journal of Fungi*, 5(4), 92.

- Walsh, T. J., Goodman, J. L., Pappas, P., Bekersky, I., Buell, D. N., Roden, M., ... & Anaissie, E. J. (2001). Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3487-3496.
- Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2019). Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of Fungi*, 5(4), 106.
- Wiederhold, N. P., Patterson, T. F., Srinivasan, A., Chaturvedi, A. K., Fothergill, A. W., Wormley, F. L., ... & Lopez-Ribot, J. L. (2017). Repurposing auranofin as an antifungal: In vitro activity against a variety of medically important fungi. *Virulence*, 8(2), 138-142.
- Xisto, M. I. D. D. S., Rollin-Pinheiro, R., de Castro-Almeida, Y., dos Santos-Freitas, G. M. P., Rochetti, V. P., Borba-Santos, L. P., ... & Barreto-Bergter, E. (2023). Promising antifungal molecules against mucormycosis agents identified from Pandemic response box®: in vitro and in silico analyses. *Journal of Fungi*, 9(2), 187.
- Xisto, M. I. D. D. S., Rollin-Pinheiro, R., Rochetti, V. P., Castro-Almeida, Y. D., Borba-Santos, L. P., Santos-Freitas, G. M. P. D., ... & Barreto-Bergter, E. (2023). Miltefosine: A Repurposing Drug against Mucorales Pathogens. *Journal of Fungi*, 9(12), 1166.
- Xue, H., Li, J., Xie, H., & Wang, Y. (2018). Review of drug repositioning approaches and resources. *International Journal of Biological Sciences*, 14(10), 1232.
- Yaakoub, H., Staerck, C., Mina, S., Godon, C., Fleury, M., Bouchara, J. P., & Calenda, A. (2021). Repurposing of auranofin and honokiol as antifungals against *Scedosporium* species and the related fungus *Lomentospora prolificans*. *Virulence*, 12(1), 1076-1090.
- Yeu, Y., Yoon, Y., & Park, S. (2015). Protein localization vector propagation: a method for improving the accuracy of drug repositioning. *Molecular BioSystems*, 11(7), 2096-2102.
- Zamani, A., Jeyhanipour, A., Edebo, L., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. (2008). Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8314-8318.
- Zeng, X., Tu, X., Liu, Y., Fu, X., & Su, Y. (2022). Toward better drug discovery with knowledge graph. *Current Opinion in Structural Biology*, 72, 114-126.
- Zhang, Q., Liu, F., Zeng, M., Mao, Y., & Song, Z. (2021). Drug repurposing strategies in the development of potential antifungal agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 5259-5279.
- Zhao, W., Sachsenmeier, K., Zhang, L., Sult, E., Hollingsworth, R. E., & Yang, H. (2014). A new bliss independence model to analyze drug combination data. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(5), 817821.