

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

Maíra Haase Pacheco

**ESTUDO *IN VITRO* E *EX VIVO* DO CLIOQUINOL E DA NITROXOLINA EM  
CÓRNEA EQUINA PARA O TRATAMENTO DE CERATITE FÚNGICA**

Porto Alegre

2023

Maíra Haase Pacheco

**ESTUDO *IN VITRO* E *EX VIVO* DO CLIOQUINOL E DA NITROXOLINA EM  
CÓRNEA EQUINA PARA O TRATAMENTO DE CERATITE FÚNGICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

Porto Alegre

2023



“Métodos alternativos são procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que não utilizem animais; usem espécies de ordens inferiores; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos *ex vivos*; diminuam ou eliminem o desconforto.”

DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, BRASIL

## AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo a oportunidade de voltar estudar em uma instituição pública, gratuita e de qualidade, é um orgulho ser “filha” da UFRGS e voltar a me aperfeiçoar nesta instituição séria. Dito isso, meu maior agradecimento vai para o meu professor orientador Alexandre Fuentefria, obrigada professor pela oportunidade, por ter sempre acreditado no meu potencial, desde a 1ª entrevista, e por manter seus alunos sempre motivados, incentivando o seu crescimento profissional e pessoal! Ao meu coorientador professor João Antonio Tadeu Pigatto por além de ter me apresentado e me ensinado o mundo da oftalmologia, continuar a me acompanhar nessa jornada!

Ao meu companheiro de vida, Otávio, por ser paciente, parceiro e estar sempre preocupado em evoluir ao meu lado e me ajudar diretamente com esse trabalho, tu és uma inspiração para muitos! A minha família pelo suporte e serem a minha válvula de escape.

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto, todos os colegas do Laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS, pela companhia e ensinamentos durante as tardes e noites dentro do laboratório de pesquisa.

Ao Serviço de Patologia Veterinária da UFRGS pela avaliação histopatológica das córneas, em especial a Marcele Bettim Bandinelli e Paula Reis Ribeiro.

Ao abatedouro Foresta pela disponibilidade de acesso, sempre dispostos a contribuir com a ciência. Em especial ao colega Conrado Pinheiro, pela colheita dos bulbos oculares, tua contribuição para esse trabalho foi de suma importância.

Aos animais, sempre por eles.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	3
<b>2.1</b>	Objetivo Geral .....	3
<b>2.2</b>	Objetivos Específicos .....	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
<b>3.1</b>	Anatomofisiologia ocular .....	4
<b>3.2</b>	Ceratites fúngicas.....	7
3.2.1	Fisiopatogenia da ceratomicose.....	9
3.2.2	Diagnóstico .....	11
3.2.3	Terapia antifúngica.....	17
3.2.4	Terapia convencional de ceratite fúngica .....	19
3.2.5	Clioquinol.....	24
3.2.6	Nitroxolina .....	25
3.3	Modelos experimentais <i>ex vivo</i> na oftalmologia .....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1	Seleção dos microrganismos .....	30
4.2	Seleção dos bulbos oculares equinos .....	30
4.3	Agentes Antifúngicos.....	30
4.4	Teste de suscetibilidade aos agentes antifúngicos .....	31
4.5	Preparo dos bulbos oculares.....	32
4.6	Infecção das córneas .....	34
4.7	Tratamento antifúngico.....	34
4.8	Avaliação do crescimento fúngico .....	35
4.9	Avaliação histopatológica .....	35
4.10	Avaliação de toxicidade.....	36
4.11	Análise estatística .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39
5.1	Teste de suscetibilidade aos agentes antifúngicos .....	39
5.2	Avaliação do crescimento fúngico e da resposta aos tratamentos antifúngicos.....	39
5.2.1	Avaliação do crescimento de <i>Candida</i> sp. e resposta aos tratamentos	40
5.2.2	Avaliação do crescimento de <i>F. solani</i> e resposta aos tratamentos	

antifúngicos.....	45
5.3 Avaliação histopatológica.....	46
5.4 Avaliação de toxicidade.....	47
5.4.1 Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM).....	47
5.4.2 Teste de membrana corioalantóide associado ao azul de trypan (CAM-TBS).....	48
5.4.3 Teste de opacidade e permeabilidade da córnea bovina.....	48
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>9 APÊNDICES.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comprimento axial do bulbo do olho e espessura da córnea de diferentes espécies. ....	5
Tabela 2. Antifúngicos oftálmicos para o tratamento de ceratite fúngica. ....	18
Tabela 3. Escore de pontuação para o teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. ....	36
Tabela 4. Resultado da concentração inibitória mínima dos fármacos frente às cepas de <i>Candida</i> spp. e <i>Fusarium solani</i> . ....	39
Tabela 5. Valores de crescimento de unidade formadora de colônia (UFC) por botão córneo-escleral infectado por <i>Candida</i> sp. de acordo com o a cepa e grupo. Máximo, mínimo e Média de Log de UFC. ....	41
Tabela 6. Valores de crescimento de unidade formadora de colônia (UFC) por botão córneo-escleral infectado por <i>F. solani</i> ATCC 36031 de acordo com o grupo. Máximo, mínimo e Média de Log de UFC ....	45
Tabela 7. Média e desvio padrão da pontuação do escore de irritação obtido através do teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha ....	47
Tabela 8. Média e desvio padrão da pontuação do escore de irritação obtido através do teste de membrana corioalantóide associado ao azul de trypan ....	48
Tabela 9. Transmitância entre as leituras de transmitância, a média das diferenças e o desvio padrão das dos compostos de natamicina, clioquinol, nitroxolina, NaOH e solução salina. ....	49
Tabela 10. Valores de crescimento de unidade formadora de colônia por botão córneo-escleral infectado por <i>F. solani</i> ATCC e <i>Candida</i> sp. de acordo com o grupo. ....	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bulbo do olho. ....	4
Figura 2. Corte histológico da córnea equina. ....	6
Figura 3. Olho equino apresentando úlcera superficial por ceratomicose e placa fúngica.....	11
Figura 4. Olho equino apresentando ceratite fúngica. ....	11
Figura 5. Raspado direto de córnea .....	13
Figura 6. Cultura fúngica de <i>F. solani</i> .....	14
Figura 7. Apresentação clínica e imagem de OCT de ceratite fúngica equina ...	15
Figura 8. Estrutura química da natamicina .....	20
Figura 9. Estrutura química do voriconazol .....	22
Figura 10. Estrutura química do clioquinol .....	24
Figura 11. Estrutura química da nitroxolina.. .....	26
Figura 12. Bulbo do olho equino e durante a imersão em iodopovidona 10% ....	32
Figura 13. Aparato de silicone estéril com 6 botoões córneo-esclerais.....	33
Figura 14. Botão córneo-escleral preenchido com ágar .....	33
Figura 15. Falcon com botões córneo-esclerais e água destilada estéril. ....	35
Figura 16. Botão córneo-escleral equino após 24 horas de incubação pelo método <i>ex vivo</i> de ceratite fúngica. ....	40
Figura 17. Placa de ágar Sabouraud com UFC de <i>C. parapsilosis</i> em diferentes diluições. ....	40
Figura 18. Avaliação do crescimento fúngico de <i>Candida</i> sp. e a relação do efeito do tratamento com voriconazol 1% e natamicina 5% clioquinol 0,05%, clioquinol 0,5%, nitroxolina 0,05% e nitroxolina 0,5% pelo modelo <i>ex vivo</i> de ceratite fúngica entre todos os grupos testados.. ....	42
Figura 19. Avaliação do crescimento fúngico de <i>Candida</i> sp. e do tratamento com voriconazol 1% e natamicina 5% pelo modelo <i>ex vivo</i> de ceratite fúngica de acordo com as cepas testadas.....	43
Figura 20. Avaliação do crescimento fúngico de <i>Candida</i> sp. e a relação do efeito do tratamento com clioquinol 0,05%, clioquinol 0,5%, nitroxolina 0,05% e nitroxolina 0,5% pelo modelo <i>ex vivo</i> de ceratite fúngica de acordo com a cepa. ....	44

Figura 21. Avaliação do crescimento fúngico de <i>Candida</i> sp. e do tratamento com voriconazol 1% e natamicina 5% pelo modelo <i>ex vivo</i> de ceratite fúngica por grupo de teste em relação às cepa. ....	44
Figura 22. Avaliação do crescimento fúngico de <i>F. solani</i> e do tratamento com voriconazol 1%, natamicina 5%, clioquinol 0,05%, clioquinol 0,1%, clioquinol 0,5%, nitroxolina 0,05%, nitroxolina 0,1% e nitroxolina 0,5% pelo modelo <i>ex vivo</i> de ceratite fúngica. ....	46
Figura 23. Corte histológico da córnea equina infectada por <i>C. albicans</i> e <i>F. solani</i> , .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAID	Desvio imunológico da câmara anterior
AS-OCT	Tomografia de coerência óptica do segmento anterior
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
ATCC	American Type Culture Collection
BCOP	Opacidade e permeabilidade de córnea bovina
CA	<i>Candida albicans</i>
CAM-TBS	Teste de membrana corioalantóide associado ao azul de trypan
CG	<i>C. glabrata</i>
COVID	<i>Coronavirus disease 19</i>
CP	<i>C. parapsilosis</i>
CQ	Clioquinol
CT	<i>C. tropicalis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HET-CAM	Teste em membrana corio-alantóide de ovo embrionado de galinha
Log	Logarítimo
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MIC	Concentração inibitória mínima
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
NATA	Natamicina
NTX	Nitroxolina
SMON	Síndrome de Neuropatia Mielo-Óptica Subaguda
UFC	Unidade formadora de colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VCZ	Voriconazol
8HQ	8-hidroxiquinolina

## 1. INTRODUÇÃO

A ceratite fúngica é uma doença ocular grave com péssimo prognóstico à visão e a manutenção do bulbo do olho para o homem e para equinos. Milhões de pessoas ao ano perdem a visão para esta doença. Até o momento não se tem o conhecimento sobre a casuística mundial equina, mas é sabido que pelo menos 10% dos atendimentos são devido a infecções fúngicas oculares. A negligência e o sub-diagnóstico por parte da classe médica e veterinária, bem como devido à baixa sensibilidade dos testes convencionais de diagnóstico de micoses, supõem que a casuística seja maior do que a relatado, e por isso, também é descrita como uma epidemia silenciosa. A ceratomicose origina-se a partir da inoculação traumática de fungos ambientais, ou devido à penetração de fungos da microbiota ocular por condições de maior suscetibilidade das barreiras corneanas. Os patógenos mais frequentes são espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Candida*.

Dentre os outros fatores agravantes para essa problemática, está a escassa disponibilidade de fármacos antifúngicos aliada ao aumento de resistência fúngica global, e mesmo quando se opta por um fármaco para o tratamento, as barreiras imunes oculares dificultam ou impedem a permeabilidade das moléculas nos tecidos, resultando em desfechos clínicos desfavoráveis. Os tratamentos antifúngicos propostos para ceratomicose são controversos, em geral, na literatura, os estudos possuem um número amostral baixo ou possuem vieses importantes, gerando incertezas sobre as melhores indicações terapêuticas. A natamicina é o tratamento de primeira escolha para as ceratomicoses, porém o seu alto peso molecular dificulta a sua penetração nas camadas mais profundas do estroma, ademais, apesar do amplo espectro de ação, destaca-se a preocupação aos relatos de resistência microbiana aos principais antifúngicos, bem como, de repostas clínicas um tanto quanto insatisfatórias. O voriconazol vem se destacando com interesse médico e veterinário para solucionar as demandas do tratamento com natamicina, porém, mesmo se tratando de uma molécula de baixo peso molecular, com melhor permeabilidade e melhores perfis de suscetibilidade *in vitro*, existem relatos conflitantes sobre a sua eficácia terapêutica e falhas no tratamento para ceratites por *Fusarium* sp., mesmo com CIM relativamente baixas.

Diante deste cenário, algumas estratégias estão sendo levantadas como o desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas, a otimização de dosagem, a

terapia combinada e o reposicionamento de fármacos. Dentre estas, o reposicionamento de fármaco é uma alternativa rentável e com menor tempo de desenvolvimento, visto que por se tratar de produtos comercialmente disponíveis, a toxicidade, tolerabilidade e farmacocinética são conhecidos.

O clioquinol e a nitroxolinas são fármacos utilizados, com características versáteis, que já tiveram empregos diversos, como antimicrobianos, antioxidantes, antiparasitários, oncológicas, no tratamento de doenças neurológicas e degenerativas e frente à COVID-19 . O efeito antifúngico de ambas as formulações já é conhecido, mas precisa ser mais bem elucidado

Com intuito de se conquistar melhores resultados clínicos, estudos de ceratomicose tentaram correlacionar a resposta *in vitro* com a *in vivo*, porém, poucos autores obtiveram resultados concretos e confiáveis desta correlação. Frente a isso, as pesquisas por metodologias *ex vivo* são alternativas viáveis, cujos os resultados são mais próximos da resposta clínica, pois se utilizam de tecidos extracorpóreos em situações que mimetizam a realidade. As semelhanças acerca da etiologia, patógenos, manifestações clínicas e tratamento entre a ceratomicose humana e equina, fundamentam-se no fato de que essas são as espécies que desenvolvem esta doença com maior frequência, torna o olho equino um modelo experimental ideal para a avaliação de ceratites fúngicas.

Frente a esta problemática, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia experimental *ex vivo* de ceratomicose em córneas equinas afim de avaliar o potencial antifúngico de clioquinol e da nitroxolina para o tratamento de ceratite fúngica frente aos principais patógenos – *F. solani* ATCC 36031, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* CMT01, *C. glabrata* CGMT21 e *C. parapsilosis* CPMT25, além da avaliação da toxicidade ocular destes fármacos, e compará-los com a eficácia antifúngica dos fármacos que são utilizados rotineiramente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antifúngica e a toxicidade do clioquinol e da nitroxolina em um modelo *ex vivo* de ceratite fúngica em córneas equinas.

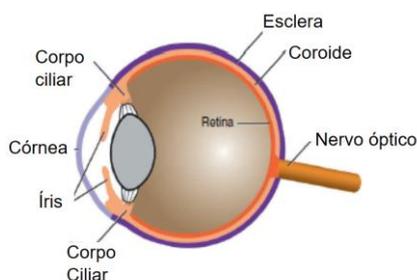
### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Padronizar um modelo *ex vivo* de infecção fúngica em córneas equinas para testagem de compostos antifúngicos;
- 2.2.2 Determinar o perfil de suscetibilidade *in vitro* de *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* à natamicina, ao voriconazol, ao clioquinol e à nitroxolina;
- 2.2.3 Avaliar o efeito antifúngico no modelo *ex vivo* de ceratite fúngica da natamicina, voriconazol, clioquinol e nitroxolina por *F. solani*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* ;
- 2.2.4 Avaliar os aspectos anatomopatológicos e morfológicos das córneas infectadas experimentalmente em um modelo *ex vivo* de ceratite fúngica infectadas por *F. solani*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* tratadas ou não com natamicina, clioquinol e nitroxolina;
- 2.2.5 Avaliar a toxicidade de superfície ocular ao clioquinol, nitroxolina e natamicina em modelos *ex vivo*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Anatomofisiologia ocular

O bulbo do olho é constituído por 3 túnicas sobrepostas (Figura 1), sendo a mais interna, a túnica nervosa (retina e nervo óptico); a média ou túnica vascular (íris, corpo ciliar e coróide); a externa ou túnica fibrosa (córnea e esclera) (GELATT, 2020). A túnica fibrosa determina o formato do bulbo do olho, que entre espécies, são comparativamente uniformes, porém de tamanhos variados (Tabela 1). Outra atribuição à túnica fibrosa, devido a transparência da córnea, é permitir a refração da luz, papel este de suma importância para acuidade visual (SAFATE; GALERA, 2023).



*Figura 1. Bulbo do olho constituído por 3 túnicas: túnica nervosa (retina e nervo óptico); túnica vascular (íris, corpo ciliar e coróide); túnica fibrosa (córnea e esclera). Adaptado de: GELATT, 2020.*

A córnea corresponde a 1/5 da túnica fibrosa e é a porção mais exposta do bulbo do olho, e por essa razão, também é a mais suscetível a traumas (GELATT, 2020; MUSTIKKA; GRÖNTHAL; PIETILÄ, 2020). Apesar de em algumas espécies, como cães, gatos e humanos, ter aspecto arredondado, a córnea possui o formato elíptico, entretanto, nos animais ungulados, como o equino, essa diferença entre o diâmetro horizontal e o vertical é mais aparente (GELATT, 2020). O tamanho e a espessura da córnea variam entre espécies, raças, indivíduos e localização no tecido, além das variações diárias (Tabela 1) (AUGUSTEYN; MOHAMED, 2022).

Tabela 1 Comprimento axial do bulbo do olho e espessura da córnea de diferentes espécies.

<b>Espécie</b>	<b>Comprimento axial do bulbo do olho (mm)</b>	<b>Espessura da córnea (µm)</b>
<b>Equino</b>	39,23 ± 1,26	800 ± 50
<b>Canino</b>	20 ± 1,6	611,2 ± 40,3
<b>Felino</b>	20,91 ± 0,53	629,08 ± 47,05
<b>Humano</b>	24.46 ± 0,65	542,3 ± 36,7

Adaptado de: (ZHAO et al., 2007; GELATT, 2020; AUGUSTEYN; MOHAMED, 2022)

Histologicamente, a córnea é dividida em 4 a 6 camadas (Figura 2), sendo elas: a mais externa, o epitélio, que fica intimamente associado ao filme lacrimal; o estroma, que corresponde a cerca de 90% da espessura corneana; a membrana de descemet, a membrana basal do endotélio; endotélio, que está em contato com o meio intraocular (GELATT, 2020). Algumas espécies, como humanos, primatas e alguns herbívoros, possuem uma quinta camada histológica, a membrana de Bowman, localizada entre o epitélio e o estoma, a qual confere resistência (AUGUSTEYN; MOHAMED, 2022; SAFATE; GALERA, 2023) .

Imperceptível à histologia, porém considerada a sexta camada da córnea, devido à forte interação entre elas, está o filme lacrimal, também denominado de filme pré-corneano. Esta interação, somada a conformação e organização estrutural da córnea conferem a este tecido o maior poder dióptrico do bulbo do olho (MAGGS; MILLER; OFRI, 2018).

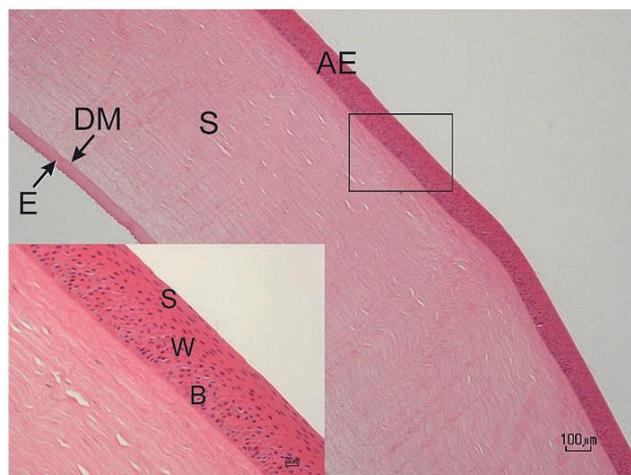


Figura 2. Corte histológico da córnea equina. Epitélio (AE); estroma (S); membrana de Descemet (DM); endotélio (E). (GELATT, 2020)

Alguns fatores são determinantes para a manutenção desta característica, o mais importante deles é a perfeita organização paralela das lamelas de colágeno do estroma da córnea e a devida integração do colágeno com a matríz amorfa celular do estroma (constituída por proteoglicanos selecionados, como lumican, ceratocano, osteoglicina e decorina) (GELATT, 2020). Também são fatores importantes para a manutenção da transparência da córnea: o epitélio estratificado não queratinizado; a ausência de vasos sanguíneos e pigmentos; inervação com ausência de mielina; o estroma da córnea composto de 80% de água, bem como o estado de semi-desidratação, ou de deturgescência da córnea (MAGGS; MILLER; OFRI, 2018). A desidratação relativa da córnea, deve-se a ação ativa das bombas de sódio e potássio ATPase, localizadas no endotélio corneano, e de anidrase carbônica, as quais, promovem pela estabilização do gradiente de pressão osmótica, passagem da água do estroma corneano para o filme lacrimal e para o humor aquoso (DUBIELZIG et al., 2010). Constituindo o restante da túnica fibrosa, a esclera possui composição semelhante à córnea, porém com arranjo celular desordenado, numerosos vasos e presença de pigmentos (GELATT, 2020; SAFATE; GALERA, 2023) .

O bulbo do olho é este órgão complexo com mecanismos de altíssima especificidade, que para proteger a integridade e a funcionalidade das delicadas estruturas, desenvolveu um robusto sistema de proteção próprio, formado por barreiras mecânicas para impedir a penetração de antígenos, no entanto, quando estas barreiras falham, o sistema imune evita ser ativado, pois a resposta imune celular pode gerar uma cascata de fatores ainda mais deletérios para os tecidos

(GELATT, 2020). O bulbo do olho está em um sistema de semiconfinamento, revestido pela conjuntiva, uma estrutura altamente imunogênica, a fim de garantir que o sistema imune ocular permaneça inativado, esta característica é denominada de sítio de imuno-privilegio (DUBIELZIG et al., 2010; SAFATE; GALERA, 2023).

A imunidade inata inespecífica, é a primeira barreira protetiva. Formada pelas pálpebras, cílios, movimento de piscar e filme pré-corneano. O sistema de lavagem e drenagem da lágrima e a presença das bactérias comensais da conjuntiva também participam desta primeira barreira. Assim como a córnea, um tecido formado por um robusto epitélio corneano composto por +-5 camadas de células justapostas, o estroma com polaridade (hidrofílico) diferentes das demais camadas, a membrana de Descemet elástica e a camada de Bowman resistente, além de toda a resposta inata celular, formada por macrófagos, interferons, citocinas, neutrófilos e sistema complemento (DUBIELZIG et al., 2010; GELATT, 2020) . Como característica de um órgão imunoprivilegiado, o olho possui algumas barreiras físicas específicas para conter macromoléculas e microrganismo, como a barreira hemato-aquosa (epitélio não pigmentar do corpo ciliar e endotélio vascular da íris) e a barreira hemato-retiniana (endotélio dos vasos retinianos ausente de fenestrações) (GELATT, 2020).

As primeiras linhas de defesas são de extrema importância, pois como um sítio de imuno privilégio, o bulbo do olho possui algumas falhas nos artifícios de defesa. A ausência de vasos linfáticos, ausência de vasos sanguíneos na córnea, expressão reduzida da linhagens de defesas inatas da córnea e as fortes junções epiteliais do epitélio não pigmentado do corpo ciliar, bem como, a retina avascular e epitélio pigmentado da retina, permitem que as antígenos permaneçam por um longo período sem ativar o sistema imune (GELATT, 2020; DE PAIVA; ST. LEGER; CASPI, 2022). Mesmo após tantas barreiras, quando algum antígeno ou molécula consegue permear pela córnea central, câmara vítrea e pelo espaço subretiniano, uma resposta sistêmica denominado de Desvio Imunológico da Câmara Anterior (ACAID) é ativada. A ACAID induz a tolerância aos antígenos, reduzindo a chance de que respostas imunes adaptativas sejam montadas contra antígenos estranhos que estão localizados no olho e desta forma, há um “desvio” da resposta inflamatória do que normalmente ocorreria na maioria dos órgãos (GELATT, 2020; DE PAIVA; ST. LEGER; CASPI, 2022).

### 3.2 Ceratites fúngicas

As ceratites fúngicas são lesões infecciosas de etiologia micótica da córnea. O homem e o equino apresentam uma ampla distância entre a prevalência ceratite fúngica em relação às demais espécies (BERKOWSKI et al., 2019a; HOFFMAN; BURTON; LECK, 2021). Esta é uma doença oftalmológica grave, com prognóstico ruim para a manutenção da visão, que evolui para a perda do bulbo do olho em 10% dos casos no homem e 60% em equinos (BERKOWSKI et al., 2019b; BROWN et al., 2021). Devido ao sub diagnóstico clínico e laboratorial, esta é considerada uma epidemia silenciosa, embora ocorram mundialmente cerca de 1,4 milhão de casos por ano em humanos. A prevalência das ceratomicose humanas varia de acordo com a localização geográfica, sendo mais frequente em áreas agrícolas tropicais e subtropicais, correspondendo a 20% dos atendimentos de ceratite infecciosa (SANSOM; FEATHERSTONE; BARNETT, 2005; BERKOWSKI et al., 2019b; BROWN et al., 2021).

As infecções fúngicas de córnea são causadas por mais de 100 diferentes espécies de fungos, sendo 95% delas causadas por fungos filamentosos, os gêneros mais comuns são *Aspergillus* e *Fusarium*. Além disso, as infecções também podem ser provocadas por leveduras como *Candida* spp. As infecções por fungos filamentosos tendem a ser mais agressivas e ocorrem mais em climas tropicais e subtropicais, enquanto as leveduriformes em climas temperados (SHERMAN et al., 2016; CULLEN ID et al., 2019; BERMÚDEZ-JIMÉNEZ; CALDERÓN-HERNÁNDEZ, 2020; BEZERRA; HÖFLING-LIMA; OLIVEIRA, 2020; BROWN et al., 2021).

Os fungos são microrganismo comensais da microbiota conjuntival equina e humana hígida. Em equinos, os isolados mais frequentes são os dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* e *Scopulariopsis* (ROSA et al., 2003; BARSOTTI et al., 2006; SOUSA et al., 2011; BRILHANTE et al., 2017; CULLEN ID et al., 2019). Em contraste a estes resultados, um estudo mais refinado de microbioma conjuntival equino demonstrou uma grande diversidade de fungos, identificando pelo menos cinco gêneros, sendo os mais abundantes: *Leptosphaerulina* (22,7%), *Pleosporaceae* (17,3%), *Cladosporium* (16,2%) e *Alternaria* (9,8%) e em menor parte *Fusarium*(2,5%) e *Aspergillus* (1,9%), *Penicillium* e *Scopulariopsis* não foram reportados (WALSH et al., 2021). No homem, os gêneros mais frequentes do microbioma de conjuntivas híginas são *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Davidiella*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Setosphaeria* e *Haematonectria* (SHIVAJI et al., 2019; WANG et al., 2020).

Alguns fatores que propiciam o desenvolvimento desta infecção são comuns a ambas as espécies (HERMANS et al., 2017; HOFFMAN; BURTON; LECK, 2021). No homem, a condição socioeconômica confere a característica dos indivíduos afetados: homens jovens do meio rural (adultos de 20-50 anos) são mais propensos, devido suas condições sociais e laborais (BROWN et al., 2021). A vulnerabilidade social e econômica, de populações com menores condições sanitárias, menor acesso à cuidados médicos e por consequência menor consciência de boas práticas de higiene, principalmente com o uso de lentes de contato, é um fator importante para a ocorrência (SHAH et al., 2011; BROWN et al., 2021). Assim como no homem, o habitat e os hábitos dos equinos (ambiente repleto de matéria orgânica, estábulos com felpas e farpas de madeira, costume de se coçar em troncos de árvores e correr entre plantações) também propiciam a inoculação de uma variedade de agentes causais como plantas, animais e até mesmo poeiras (SHERMAN et al., 2016). O bulbo do olho proeminente e lateralizado dos equinos, com extensa exposição da córnea, além de ser mais suscetível a traumas, propicia a evaporação e a instabilidade do filme lacrimal (BROOKS; GALERA, 2012). Outra interação entre a inoculação fúngica de córnea no homem e em equinos são as lesões ulcerativas por herpes vírus (DEORUKHKARL; KATIYARL; SAINIL, 2012; VOELTER-RATSON et al., 2013; SHERMAN et al., 2016; MUSTIKKA; GRÖNTHAL; PIETILÄ, 2020; BROWN et al., 2021).

### 3.2.1 Fisiopatogenia da ceratomicose

A ceratomicose manifesta-se a partir da quebra da barreira epitelial da córnea, seguida da inoculação de agentes fúngicos no estroma corneano pela inoculação direta -lesões traumáticas-. Outra forma de manifestação da doença se dá pela infecção oportunista da microbiota ocular a partir da quebra da homeostase local da córnea por úlceras de córneas prévias, uso prolongado de antibióticos, corticosteroides, instabilidade do filme lacrimal, uso de lentes de contato, pós-operatório ou por indivíduos imunocomprometidos, fatores estes que impossibilitam a defesa e propiciam a infecção por fungos (VOELTER-RATSON et al., 2013; BERKOWSKI et al., 2019b; CULLEN ID et al., 2019; MUSTIKKA; GRÖNTHAL; PIETILÄ, 2020).

As apresentações clínicas irão variar de acordo com o grau de degradação do estroma corneano, grau de inflamação tecidual e as características físicas e

metabólicas do agente infeccioso (SAFATE; GALERA, 2023). As ceratites superficiais (Figura 3) são ocasionadas logo abaixo do epitélio corneano, após a inoculação no estroma superficial, por quebra da barreira epitelial ou por lesões ulcerativas pré-existentes (BROOKS; GALERA, 2012). Alterações no filme lacrimal, microerosões de córnea, úlcera superficial e opacidade e placas corneanas superficiais são descritas (CULLEN ID et al., 2019). Após instalada a infecção, se não combatida, o fungo inicia o seu crescimento se desenvolvendo e se dissemina mais profundamente no estroma em busca de nutrição, em direção à membrana de Descemet, agravando o quadro para uma úlcera corneana profunda, ou ceratite estromal (VOELTER-RATSON et al., 2013; BERKOWSKI et al., 2019b; CULLEN ID et al., 2019; MUSTIKKA; GRÖNTHAL; PIETILÄ, 2020). Se não contida a degradação tecidual o quadro evolui para perfuração ocular ou endoftalmite (BEZERRA; HÖFLING-LIMA; OLIVEIRA, 2020). A ceratite estromal também pode manifestar-se a partir de uma penetração traumática com inoculação no estroma corneano (SMITH; PUCKET; GILMOUR, 2014). Quando a velocidade de cicatrização do epitélio foi maior que a capacidade imunológica do paciente de combater à infecção, haverá o desenvolvimento de um abscesso estromal (Figura 4) (DE LINDE HENRIKSEN et al., 2014; SMITH; PUCKET; GILMOUR, 2014; MUSTIKKA; GRÖNTHAL; PIETILÄ, 2020).

A ceratomicose geralmente ocorre de forma subaguda e dolorosa, os pacientes apresentam edema palpebral, blefarospasmo, fotofobia, epífora, hiperemia conjuntival, quemose e secreção mucosa ou purulenta, por semanas, tendo a ter um curso mais longo quando comparada a ceratites bacterianas (BROOKS; ANDREW; NASISSE, 1998; VOELTER-RATSON et al., 2013; CULLEN ID et al., 2019; BERKOWSKI et al., 2019b; WEI et al., 2023).

A descrição dos sinais clínicos é semelhante em ambas às espécies (SHARMA et al., 2022; SMITH; PUCKET; GILMOUR, 2014). As ceratites superficiais são descritas como lesões secas, firmes e sólidas, com diferentes formas de apresentações clínicas, como um denso infiltrado celular branco-acinzentado, com aparência de floco de neve ou de placa, com a margem da lesão podendo se infiltrar no estroma com formatos de ramificações, difuso ou multifocal (Figura 4) (LEDBETTER, 2017). Na periferia de uma lesão principal, podem ser observados infiltrados adjacentes (lesões satélites) (SHARMA et al., 2022). Nas ceratites por *Candida* sp., no homem, é descrita uma lesão central branca ulcerada, com extenso e discreto infiltrado estromal ao redor (*collar button*) (WEI et al., 2023) . A medida que

há a invasão pelo estroma, pode haver a evolução para placas endoteliais (BERKOWSKI et al., 2019b; SHARMA et al., 2022; WHITMAN et al., 2022; WEI et al., 2023). A produção de melanina pelos fungos demáceos, confere às ceratites por esses agentes, o aspecto pigmentado da lesão (Figura 3) (KUMAR et al., 2019). Complicações frequentemente presente relacionadas a processos inflamatórios locais incluem: hipopio, intensa neovascularização de córnea, derretimento estromal (*melting*), esclerite, endoftalmite, graus variados de uveíte, iridociclite ou panoftalmite e celulite orbitária (SANSOM; FEATHERSTONE; BARNETT, 2005; VOELTER-RATSON et al., 2013; WADA et al., 2013; HERMANS et al., 2017).



Figura 3. Bulbo do olho equino apresentando (A) úlcera superficial por ceratomicose e (B) Placa fúngica pigmentada de cor caramelo, neovasos e edema de córnea (BROOKS; GALERA, 2012; CULLEN ID et al., 2019)

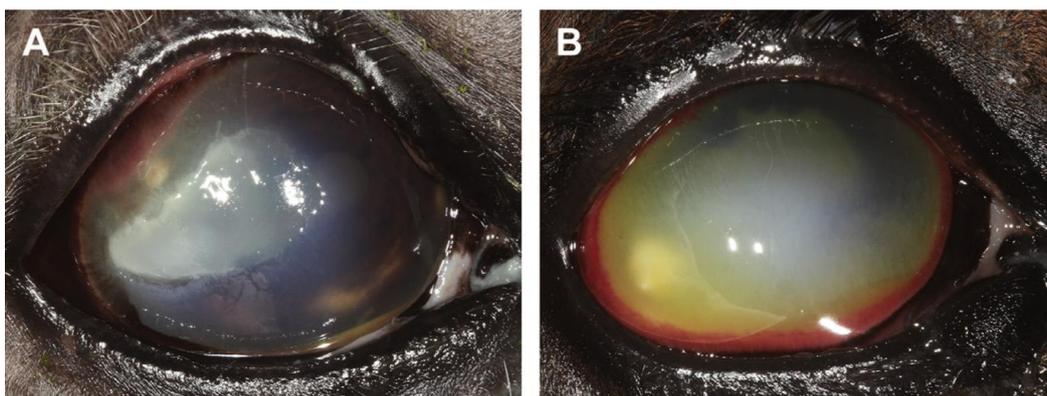


Figura 4. Bulbo do olho equino apresentando ceratite fúngica. (A) Úlcera de córnea associada à placa fúngica branca e seca e hipópio leve. (B) Abscesso estromal fúngico associado à uveíte anterior (LEDBETTER, 2017)

### 3.2.2 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico laboratorial de ceratite ulcerativa infecciosa é desafiador e

deve ser baseado mediante uma anamnese minuciosa associado a exames laboratoriais (BEZERRA; HÖFLING-LIMA; OLIVEIRA, 2020). O diagnóstico muitas vezes é limitado pelo acesso dos médicos e de médicos veterinários aos exames microbiológicos tornando o manejo desta infecção ainda mais desafiador (DEORUKHKARL; KATIYARL; SAINIL, 2012).

### 3.2.2.1 Microscopia direta – raspado de córnea

A microscopia direta é um exame rápido, simples e barato que permite a identificação das estruturas fúngicas, sendo um diferencial para as ceratites microbianas (Figura 5). O raspado de córnea pode ser realizado com anestesia tópica, com uma espátula. Devido à profundidade das lesões, o swab não é o instrumental mais indicado (BEZERRA; HÖFLING-LIMA; OLIVEIRA, 2020).

Técnicas convencionais como as colorações de Gram, branco de calcofluor, hidróxido de potássio ou azul de lactofenol podem ser usadas, assim como colorações mais especializadas como Giemsa, ácido periódico Schiff (PAS) e a técnica de impregnação pela prata de Gomori (MAHMOUDI et al., 2018). Apesar de um exame de triagem, a sensibilidade para detecção de fungos na microscopia direta é relativamente alta. A técnica mais indicada é a coloração com branco de calcofluor, que quando associada ao hidróxido de potássio, demonstra uma sensibilidade de 98,3%, enquanto a visualização somente com hidróxido de potássio conferiu uma sensibilidade de 61-94%. Com o azul de lactofenol uma sensibilidade de 85% foi observada, e apenas entre 36-50% quando a coloração de Gram foi realizada (ZHANG et al., 2010; BROWN et al., 2021).

A microscopia direta apesar de rápida, dificilmente permite a identificação dos fungos a nível de gênero ou espécie. Portanto, sempre que possível, a cultura fúngica deve ser solicitada (LAVIER, 2021).



*Figura 5. Raspado direto de córnea com presença de estrutura fúngica. (FERRER; ALIÓ, 2011)*

#### 3.2.2.2 Cultura fúngica

A cultura fúngica é o padrão ouro para o diagnóstico de ceratites fúngicas, além de permitir a determinação da suscetibilidade aos antifúngicos (Figura 6) (DEORUKHKARL; KATIYARL; SAINIL, 2012; SHERMAN et al., 2016). A coleta para a cultura fúngica preferencialmente deve ser feita previamente ao início da terapia antifúngica, quando possível, se já tiver iniciado o tratamento, suspende-lo por 24 horas antes da coleta, caso contrário, a inoculação pode ser feita em meio líquido afim de diluir o fármaco (BEZERRA; HÖFLING-LIMA; OLIVEIRA, 2020). Para a realização do exame deve se iniciar aplicando uma gota de colírio anestésico sem conservante, e também, deve-se avaliar a possibilidade de sedação do paciente para coleta adequada (LAYER, 2021). A remoção de muco e detritos celulares aumenta as taxas de sucesso no diagnóstico (TING et al., 2022). Para realizar o esfregaço da córnea, pode ser utilizada uma agulha hipodérmica, a face não cortante de uma lâmina de bisturi ou uma espátula de Kimura estéril. A coleta deve ser feita no estroma profundo, em especial em casos de abscessos corneanos com integridade do epitélio corneano. (LAYER, 2021; TING et al., 2022). Os meios de cultura mais indicados são: ágar sangue, ágar chocolate e ágar Sabouraud dextrose. Deve ser inoculado em estrias em formato de C, evitando a perfuração do ágar. Somente o crescimento fúngico em torno da área de inoculação deve ser considerado (LECK, 2009).

A cultura fúngica é um exame imprescindível sempre que há a suspeita de ceratite fúngica, porém, devido à grande variabilidade morfológica da macroscopia das

colônias e das estruturas reprodutivas, a identificação a nível de espécie ou genótipo (linhagem) pode não ser eficiente (RIBEIRO et al., 2021). Resultados falsos negativos devido à pequena quantidade amostral podem ocorrer, bem como a incorreta identificação de contaminantes (DEORUKHKARL; KATIYARL; SAINIL, 2012). Ademais, o tempo para a conclusão do exame pode ultrapassar três semanas, um fator crucial para o agravamento do quadro clínico, devido ao atraso no diagnóstico (LECK, 2009; BEZERRA; HÖFLING-LIMA; OLIVEIRA, 2020; BROWN et al., 2021).

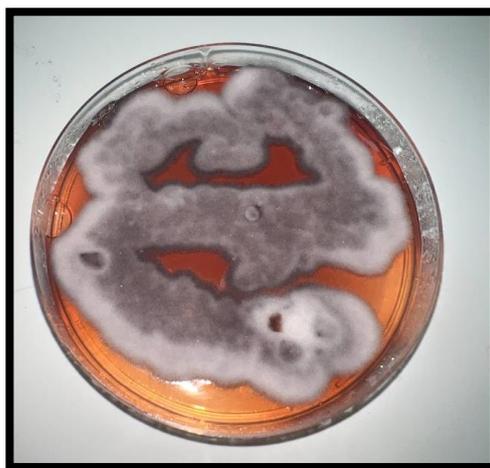


Figura 6. Cultura fúngica de *F. solani* em ágar Sabouraud Dextrose.  
Imagem do autor

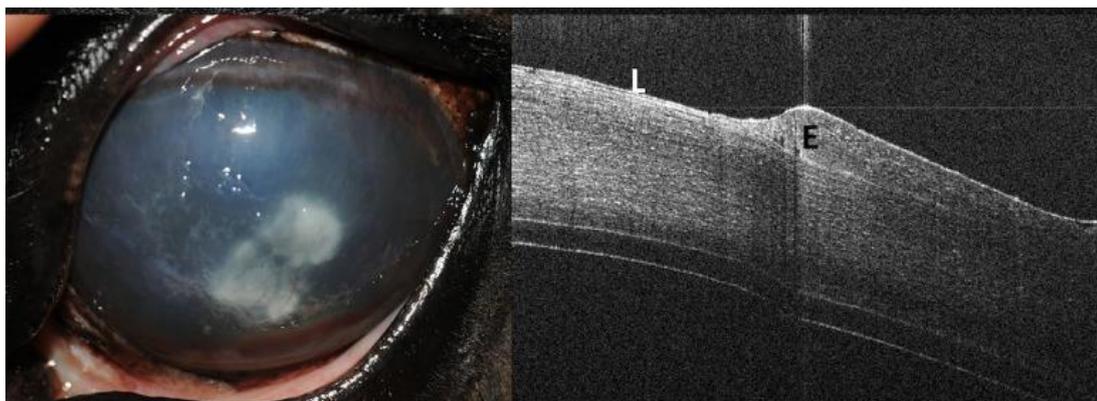
### 3.2.2.3 Diagnóstico molecular

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método de diagnóstico molecular, baseado em um rápido ensaio enzimático altamente sensível que, a partir de uma pequena amostra, permite a amplificação de um fragmento de DNA, possibilitando a identificação dos agentes causais presentes. Outras técnicas com maior sensibilidade podem ser utilizadas, como o nested PCR, multiplex PCR, PCR por transcriptase reversa e espectrometria de massa (MALD-TOF) (TING et al., 2022; WANG et al., 2023b).

A rapidez e a alta sensibilidade dos diagnósticos moleculares tem sido um grande incentivo dos pesquisadores para a identificação das ceratites fúngicas, no entanto, o alto custo e o difícil acesso, ainda constitui-se um entrave na abordagem clínica (BROWN et al., 2021; TING et al., 2022).

### 3.2.2.4 Tomografia de coerência óptica - OCT

A tomografia de coerência óptica do segmento anterior (AS-OCT) é uma excelente ferramenta de diagnóstico por imagem, que vem sendo amplamente utilizada para identificar, caracterizar, quantificar e monitorar o progresso de diversas doenças de córnea (BLANCHARD; BARR; GILGER, 2019). A OCT fornece imagens precisas de todas as camadas da córnea, mesmo em córneas opacas, edemaciadas, ou com placas e necroses que impeçam no exame clínico a visualização das camadas mais profundas, ideal para avaliação das ceratites fúngicas (Figura 7) (RODRIGUEZ GALARZA; MCMULLEN, 2020). A possibilidade de mensuração da espessura corneana, permite avaliar o risco de perfuração, prever a resposta ao tratamento, além caracterizar as lesões de acordo com o agente etiológico, já descrito para ceratite viral, bacteriana, fúngica ou por *Acanthamoeba* (OLIVEIRA et al., 2020; WANG et al., 2020).



*Figura 7. Apresentação clínica (esquerda) e imagem de OCT (direita) de ceratite fúngica equina. A perda (L) e o espessamento (E) epitelial evidenciados. (BLANCHARD; BARR; GILGER, 2019)*

### 3.2.2.5 Microscopia confocal

O exame de microscopia confocal da córnea é uma técnica não invasiva que permite o diagnóstico em tempo real a nível ambulatorial. Esta técnica permite a avaliar todas as camadas da córnea e suas estruturas a nível celular (500x), permitindo a identificação das estruturas fúngicas mesmo em córneas opacas, o que torna este um exame ideal para a identificação das ceratites fúngicas (LEDBETTER et al., 2015).

A microscopia confocal a laser e a fenda são as amplamente utilizadas em centros oftalmológicos humanos e as pesquisas demonstram um resultado promissor,

com alta sensibilidade e especificidade para as ceratomicoses (MOSHTAGHION et al., 2023; WANG et al., 2019). Alguns estudos prospectaram diferenciar a infecção a nível de espécie fúngica de acordo com a morfologia e característica da invasão fúngica (TABATABAEI et al., 2020). O alto custo de aquisição do equipamento faz dessa uma tecnologia possível, por enquanto, em países desenvolvidos (BAKKEN et al., 2022).

#### 3.2.2.6 Perspectivas

A inteligência artificial é uma atual e potente ferramenta que vem sendo fortemente estudada e implementada em todas as áreas do conhecimento e dentro da ciência oftalmológica não poderia ser diferente (WEI et al., 2023). O uso de inteligência artificial, *machine learning* e *deep learning* tem demonstrado um potencial de revolucionar o diagnóstico médico (LOKMAN; TUNDE, 2019). Já é uma realidade o uso de algoritmos para diagnóstico de doenças retinianas, glaucoma, mapeamento topográfico da córnea e cálculos de lentes intraoculares (OKE; VANDERVEEN, 2021). A tentativa de classificação e diferenciação das etiologias de ceratites infecciosas a partir da análise computacional de fotos com a lâmpada de fenda, mostrou resultados promissores de cerca de 70- 80% de acurácia (HUNG et al., 2021; KUO et al., 2020; SAINI et al., 2003).

As técnicas de diagnóstico microbiológicos tradicionais apresentam entraves referente a falha de diagnóstico, a morosidade dos processos e a necessidade de um grande volume amostral ou de patógenos, tais limitações estão sendo solucionadas a partir dos estudos ômicos (BORRONI et al., 2023). Genômica, metagenômica e proteômica são ferramentas que utilizam da bioinformática para amplificar e sequenciar o RNA ou DNA, podendo detectar, sem a necessidade de cultura microbiológica, os potenciais patógenos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, em uma pequena amostra, como num rapado de córnea (BORRONI et al., 2023). Não somente isto, os estudos ômicos possibilitam interpretar a resposta do hospedeiro e do patógeno frente à infecção, avaliar os potenciais de resistência microbiana, além de compreender a interação entre as comunidades microbianas presentes (KUO et al., 2019).

### 3.2.3 Terapia antifúngica

A escassa disponibilidade de fármacos antifúngicos é outro fator que torna essa doença tão desafiadora para médicos e veterinários (LEDBETTER, 2017; SAHAY et al., 2019). Atualmente as classes de antifúngicos disponíveis para uso oftalmológico são: polienos, azóis, pirimidinas, equinocandinas e alilaminas (Tabela 2) (SHARMA et al., 2022). A natamicina e os azóis são os mais frequentemente utilizados na prática clínica (PRAJNA et al., 2016; SHARMA et al., 2022; SMITH; PUCKET; GILMOUR, 2014). Ainda pairam muitas dúvidas sobre a melhor escolha terapêutica, mas é consenso entre os protocolos dos grandes centros oftalmológicos e organizações de saúde que a natamicina é a droga de primeira escolha (somente na forma de colírio), mas havendo resposta inadequada, o uso de voriconazol pode ser uma opção (PRAJNA et al., 2016). A indicação terapêutica para ceratite por leveduras é o tratamento com Anfotericina B (“Guidelines for the Management of at Corneal Ulcer”, 2004; PRAJNA et al., 2013).

A terapia antifúngica deve ser iniciada pela aplicação tópica (a cada hora por 48 horas, reduzindo para cada 2 ou 4 horas até a reepitelização completa, cerca de 3 semanas). Quando insuficiente, apesar de baixa evidência estatística, sugere-se associar aplicações de antifúngicos intracameraral, intraestromal e subconjuntival de anfotericina B ou voriconazol (BEZERRA; HÖFLING-LIMA; OLIVEIRA, 2020; LEDBETTER, 2017; SHARMA et al., 2022; SMITH; PUCKET; GILMOUR, 2014). A terapia sistêmica pode ser necessária em úlceras estromais profundas (>50% do estroma), recalcitrantes ou em endoftalmites, porém não existem evidências robustas da eficácia (PRAJNA et al., 2016). O tratamento cirúrgico é indicado em casos graves (BEZERRA; HÖFLING-LIMA; OLIVEIRA, 2020). Desbridamento epitelial pode auxiliar na remoção de tecidos necróticos, diminuição da carga microbiana e na melhora da penetração de drogas no estroma da córnea (SUN et al., 2018). A ceratoplastia lamelar ou penetrante é indicada no manejo de *melting* corneano e perfuração ocular (BERKOWSKI et al., 2019b; SMITH; PUCKET; GILMOUR, 2014; WADA et al., 2013). Cross-linking apresenta-se como potencial alternativa para o tratamento de ceratites infecciosas, porém os estudos com ceratite fúngica não tiveram resultados promissores, além de falhas metodológicas nos ensaios clínicos, foram observados aumento na taxa de perfurações corneanas com o uso (SAID et al., 2014; UDDARAJU et al., 2015). A crioterapia mostrou poder ser uma alternativa em um estudo experimental *in vivo* com coelhos (CHEN et al., 2015).

Tabela 2. Antifúngicos oftálmicos para o tratamento de ceratite fúngica.

ANTIFÚNGICO	VIA DE APLICAÇÃO	CARACTERÍSTICA
<b>Polienos</b>	<b>Formação de poros na parede celular ou a inibição da formação de aminoácidos e transporte de glicose pela ligação com o ergosterol</b>	
Natamicina 5%	Tópico	Único fármaco aprovado pelo FDA. Baixa penetração em tecidos oculares Bom espectro de ação contra fungos filamentosos, exceto <i>Aspergillus Flavus</i> . Pode apresentar baixa ação contra <i>Fusarium</i> .
Anfotericina B	Tópico 0,3-0,5% Intraestromal 0,02mg/ml Intracameral 5–10 mcg/0,1 ml Intravítrea	Bom espectro de ação contra <i>Candida</i> sp. Indicado para ceratites por fungos demáceos. Pode ser associada a natamicina tópica
<b>Azóis</b>	<b>Inibição do ergosterol e alteração na permeabilidade da membrana</b>	
Voriconazol 1%	Intraestromal 50-µg/0,1 m Intracameral 50-µg/0,1 m Intravítrea	Boa absorção sistêmica, atingindo vítreo e humor aquoso. Bom espectro de ação contra <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> e mínimo para Mucorales. Indicado para ceratites por fungos demáceos.
Econazol1-2%	Tópico	Baixo referencial teórico
Fluconazol 2mg/ml	Tópico Subconjuntival	Boa penetração vítrea com o uso Bom espectro contra <i>Fusarium</i> sp., embora estudos demonstrem ação inferior quando comparado a natamicina
Posaconazol 100mg/ml	Tópico	Baixo referencial teórico. Maior ação <i>in vitro</i> comparada ao voriconazol. Maior permeabilidade

		corneana.
<b>Pirimidina</b>	<b>Ação intracelular, impedindo a síntese de DNA</b>	
5-fluorcitocina (5FC)	Tópico	Baixa penetração nos tecidos oculares. Espectro de ação restrito. Atua bem contra <i>Candida</i> sp. Sinergismo com anfotericina B.
<b>Equinocandina</b>	<b>Inibição da síntese de glucanas na parede celular</b>	
Micafungina 1mg/ml	Tópico	Bom espectro de ação contra levedura resistente aos polienos e triazóis, <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> .
Caspofungina 1,5-5mg/ml	Tópico	Eficácia para <i>Candida albican</i>
<b>Alilamina</b>	<b>Inibição da enzima esqualeno epoxidase, com acúmulo de esqualeno no citoplasma e falta de ergosterol nas membranas</b>	
Terbinafina 0,25%	Tópico	Bom espectro contra filamentosos. Opção terapêutica quando há resistência à natamicina.

(LIANG et al., 2009; PRAJNA et al., 2013; GUBERT MÜLLER; KARA-JOSÉ; SILVESTRE DE CASTRO, 2013; UDDARAJU et al., 2015; PRAJNA et al., 2016; BEHRENS-BAUMANN et al., 2019; SHARMA et al., 2022; VANATHI et al., 2022)

### 3.2.4 Terapia convencional de ceratite fúngica

A natamicina, ou anteriormente chamada pimaricina, é um antifúngico da classe dos macrolídeos poliênos, com peso molecular de 665,725g/mol e fórmula empírica  $C_{33}H_{47}NO_{13}$  (Figura 8). É naturalmente produzida pela bactéria *Streptomyces natalenses*, e foi descoberto em 1955 (STRUYK et al., 1958).

A natamicina é uma molécula anfótera –básico (fração micosamina) e ácido (grupo carboxílico) e dipolar em pH 6,5, estável em pH 5-9 e fotossensível. A característica anfipática se deve ao terminal contendo o cromóforo tetraeno insaturado, rígido e completamente hidrofóbico, enquanto o lado hidroxilado é relativamente flexível e hidrofílico (PATIL; LAKHANI; MAJUMDAR, 2017).

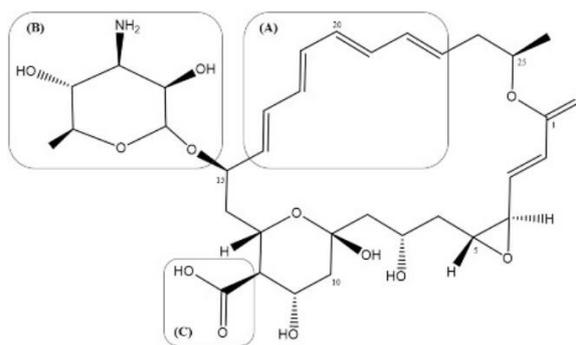


Figura 8. Estrutura química da natamicina com agrupamento (A) cromóforo tetraeno, (B) fração micosamina ligada ao núcleo por uma ligação éter e (C) grupo carboxílico. (PATIL; LAKHANI; MAJUMDAR, 2017)

Enquanto o mecanismo de ação dos demais poliênicos se deve a partir do surgimento de poros na membrana fúngica após conjugação ao ergosterol, a natamicina, após adentrar ao citoplasma da célula fúngica, atua inativando as, impedindo diversas rotas metabólicas, como a fusão de membrana celular, proteínas dependentes de ergosterol, endocitose, exocitose e fusão vacular, levando a célula fúngica ao colapso e assim impedindo o crescimento fúngico (PATIL; LAKHANI; MAJUMDAR, 2017). Além disso, atua inibindo a atividade de proteínas plasmáticas responsáveis pelo transporte de aminoácidos essenciais e açúcares para as células fúngicas, como arginina, prolina e glicose, entre outros (PATIL; LAKHANI; MAJUMDAR, 2017).

A natamicina é o único antifúngico aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (“Natamycin  $\mathcal{C}$ ”, [s.d.]) e indicado pela Organização Mundial da Saúde para o tratamento de ceratite fúngica (“*Guidelines for the Management of at Corneal Ulcer*”, 2004; SAHAY et al., 2019). No Brasil, até o momento não há formulações antifúngicas de uso comercial disponíveis em forma de colírio (ANVISA, 2023). A formulação oftálmica de natamicina, devido sua baixa solubilidade, é uma suspensão aquosa, forma grumos e aglomerados, é instável e susceptível à contaminação bacteriana (GUBERT MÜLLER; KARA-JOSÉ; SILVESTRE DE CASTRO, 2013). A aplicação é tópica, em forma de colírio, outras formas de aplicação, como subconjuntival, intracameral, intravítrea, intraestromal ou sistêmica não são indicadas devido à toxicidade tecidual - necrose conjuntival e esclerite- (GUBERT MÜLLER; KARA-JOSÉ; SILVESTRE DE CASTRO, 2013).

A formulação comercialmente disponível é composta por cloreto de benzalcônio (“Natamycin  $\mathcal{C}$ ”, [s.d.]), um conservante com alto potencial epiteliotóxico para a córnea (HEDENGRAN; KOLKO, 2023). O alto peso molecular da natamicina

dificulta a sua permeabilidade no estroma da córnea, conferindo menor eficácia para as ceratites profundas, ademais, a administração ocular de partículas maiores que 5 a 10µm pode resultar em irritação, desconforto e alta depuração ocular (CHANDASANA et al., 2014).

A suscetibilidade *in vitro* dos fungos causadores de ceratite vem sendo amplamente estudada comparando aos demais fármacos à natamicina (BETBEZE et al., 2006; PRADHAN et al., 2011; VENKATESH N PRAJNA et al., 2012, 2012; PATIL; LAKHANI; MAJUMDAR, 2017). Apesar de ser o fármaco de primeira escolha para o tratamento de infecções fúngicas na córnea, estudos demonstraram falhas no tratamento ou efeito inferior quando comparada a outros fármacos (MAHMOUDI et al., 2018). A natamicina possui amplo espectro de ação contra fungos filamentosos e leveduras, inclusive frente aos principais causadores de ceratites fúngicas como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cephalosporium* spp., *Penicillium* spp., fungos demáceos e *Candida* spp (PATIL; LAKHANI; MAJUMDAR, 2017). *Aspergillus flavus* apresentou valores CIM altos para natamicina, no entanto, a natamicina mostrou ser eficiente contra *Fusarium* sp., porém não superior à Anfotericina B (VANATHI et al., 2022). Quando comparada *in vitro* ao voriconazol, para diversas cepas de fungos filamentosos, a natamicina teve piores resultados (PRAJNA et al., 2013).

O voriconazol é um triazol de nova geração, um derivado lipofílico do fluconazol, que difere-se pela adição de um grupo metil no esqueleto do propranolol e pela substituição de uma porção triazol por um anel fluoropirimidina (Figura 9) (ARORA et al., 2011; SAHAY et al., 2019). É um inibidor da 14 a-lanosterol demetilase dependente do citocromo P450e, que resulta no acúmulo de esteróis 14a-metil, diminuindo o nível de ergosterol da parede celular fúngica. Uma molécula pequena com peso molar 349.317g/mol, que vem sendo amplamente sugerida como tratamento de ceratomíose, a fim de desbancar o tratamento com a natamicina (SAHAY et al., 2019; TAMURA et al., 2020a).

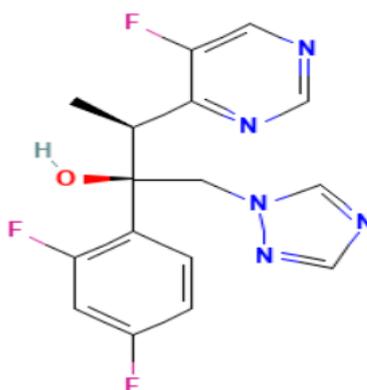


Figura 9. Estrutura química do voriconazol

O voriconazola vem despertando interesse, devido às ótimas respostas *in vitro* às principais cepas causadoras de ceratites fúngicas. Em alguns estudos demonstrando ser suscetível a todas as cepas testadas (SAHAY et al., 2019). Porém, em um robusto estudo, que comparou natamicina e voriconazol, as respostas clínicas frente ao voriconazol foram piores, em que resultou em menor acuidade visual e maiores índices de perfuração corneana nos pacientes tratados com voriconazol (PRAJNA et al., 2016). Apesar de ser uma molécula menor, e aparentemente ter melhor permeabilidade através da córnea, os fatores imunes oculares resultam em concentração deste antifúngico no sítio de infecção com valores subterapeuticos (SAHAY et al., 2019). Tendo em vista essa problemática, foram relatadas tentativas de entrega alternativas do voriconazol à córnea, como aplicação intraestromal, intracamerar ou intravítrea, porém atualmente não se tem resultados robustos comprovando a eficiência (MAHMOUDI et al., 2018). A associação do voriconazol oral ao tratamento tópico também não se mostrou benéfica para humanos (PRAJNA et al., 2016; CULLEN ID et al., 2019; VANATHI et al., 2022). Os relatos de tratamento de ceratite fúngica equina com voriconazol, geralmente são empíricos e sem embasamento estatístico robusto (SMITH; PUCKET; GILMOUR, 2014; TAMURA et al., 2020b). Em um estudo que avaliou a farmacocinética e farmacodinâmica do voriconazol em equinos, demonstrou concentrações terapêuticas do voriconazol no plasma e lágrima de equinos tratados oralmente (TAMURA et al., 2020b). Devido a inconsistência dos resultados perante ao tratamento do voriconazol e ao alto investimento financeiro, a natamicina 5% colírio segue sendo indicada como droga de primeira escolha.

Os estudos *in vitro* para amostra de ceratomicose equina são escassos, mas corroboram com os resultados encontrados em humanos (CULLEN ID et al., 2019; LEDBETTER, 2017; PEARCE et al., 2009). A suscetibilidade à natamicina demonstrou ser similar ao miconazol itraconazol e cetoconazol para as cepas *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Cylindrocarpon* spp., *Scybalidium* spp. e *Torulopsis* spp., e menos sensível ao fluconazol (BROOKS et al., 1998; LEDBETTER et al., 2007; LEDBETTER, 2017). Assim como no homem, o voriconazol mostrou ser mais efetivo que a natamicina, exceto para *Fusarium* spp., e a natamicina também apresentou baixa ação contra *Aspergillus* spp. (CULLEN ID et al., 2019; LEDBETTER, 2017; PEARCE et al., 2009) Quando comparada a sulfadiazina de prata, a natamicina mostrou valores de CIM significativamente superiores, onde a natamicina apresentou MIC de 256 a 1000 µg/mL e a sulfadiazina de prata de 1 a 64 µg/mL (BETBEZE et al., 2006).

Embora estudos *in vitro* demonstrem boa eficácia da natamicina contra *Fusarium* spp., isso não ocorreu com os resultados clínicos (PRADHAN et al., 2011; CULLEN ID et al., 2019). A terbinafina mostrou ser superior à natamicina perante a avaliação clínica, e semelhante, porém não superior, em ensaios *in vitro*, em um estudo com pequeno n amostral (LIANG et al., 2009). De maneira oposta, são descritos bons resultados ao tratamento de ceratomicose por fungos demáceos com natamicina, concordando com os baixos valores de CIM, porém, o sucesso do tratamento se deve a baixa virulência, e a tendência ao não invasão tecidual dessas espécies (PRADHAN et al., 2011). Clinicamente a natamicina demonstrou resultados semelhantes ao voriconazol 1%, itraconazol 1% para *Aspergillus* spp. e *Curvularia* spp. (KALAVATHY et al., 2005; ARORA et al., 2011).

Atualmente tem surgido diversas propostas de melhoria da eficácia dos colírios de natamicina, dentre elas a associação a ciclodextrinas - aparenta melhorar a penetração transcorneana, mantendo a suscetibilidade fúngica (WANG et al., 2023a) -, a formulação de géis e nanopartículas, de liberação lenta, ou com menor depuração no filme lacrimal, afim de diminuir o intervalo entre doses ou a concentração do fármaco (CHANDASANA et al., 2014; MOBARAKI et al., 2020).

Apesar do baixo grau de estatística dos estudos de avaliação de suscetibilidade e de ação clínica, é consenso entre os principais autores, que a natamicina segue sendo a melhor escolha para o tratamento de ceratite fúngica.

### 3.2.5 Clioquinol

O clioquinol ( $C_9H_5ClINO$ ) é um derivado da 8-hidroxiquinolina (8HQ), com peso molecular 305.5 g/mol (Figura 10) lipofílico (OYAMA et al., 2012). O clioquinol é um fármaco conhecida e empregada há mais de sete décadas como antiparasitário, no entanto, em 1958, teve seu emprego desencorajado devido a uma série de casos no Japão de Síndrome Neuropatia Mielo-Óptica Subaguda (SMON) (PIPPI et al., 2019b). Posteriormente, os casos de SMON foram elucidados, conclui-se que a toxicidade presente foi devido a altas dosagens associadas às características específicas da população afetada, como deficiência de zinco e vitamina B12 e anemia, além de características genéticas de receptores neurais. Após refutada a contraindicação, o clioquinol, voltou a ser considerado para o tratamento de diversas doenças, tendo em vista ser um fármaco com ampla versatilidade, atuando como antimicrobiano, antioxidante, antiparasitário, oncológico, Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's e até mesmo COVID (WYKOWSKI; FUENTEFRÍA; DE ANDRADE, 2022).

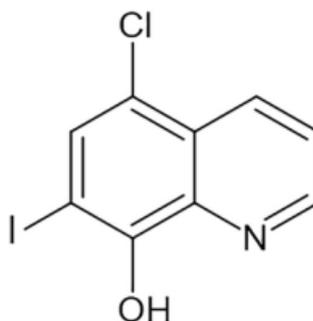


Figura 10. Estrutura química do clioquinol

A ação antifúngica do clioquinol já foi amplamente descrita, e está associada ao iodo na posição 7 e um cloro na posição 5 do anel quinolínico (JACOBUS BERLITZ et al., 2023). Nos últimos anos, a caracterização do mecanismo e espectro de ação antifúngico das 8HQ vem sendo desvendada, demonstrando um efeito predominante sobre a parede celular e sobre o ciclo mitótico, além de um eficaz efeito antibiofilme (YAN et al., 2018; CHAVES et al., 2020; PIPPI et al., 2019a). Estudos de suscetibilidade demonstraram valores de CIM do clioquinol para *Scedosporium dehoogii* (CIM 0,5-1  $\mu\text{g/mL}$ ), *Fusarium* sp (CIM 0,5-2 $\mu\text{g/mL}$ ),

*Aspergillus fumigatus* (CIM 6 mg/L), *Mucorales* sp. (CIM 4 – 8µg/mL), (LEONARDELLI et al., 2019; WYKOWSKI; FUENTEFRIA; DE ANDRADE, 2022). Resultados satisfatórios também foram demonstrados em um estudo com diferentes espécies de *Candida* sp. (CIM 0,031-0,5µg/mL), em que o clioquinol erradicou a presença de biofilmes em dispositivos intrauterinos causados por *C. glabrata* (100%), *C. tropicalis* (99.95%) e por *C. albicans* (97.92%) (PIPPI et al., 2018). Em outros estudos do mesmo grupo, verificou-se a capacidade inibir a formação das pseudohifas e hifas (PIPPI et al., 2019a), além mostrar ser um excelente tratamento sistêmico para *C. albicans* em um modelo alternativo com moscas *Drosophila melanogaster* imunodeprimidas (PIPPI et al., 2019b). Outros estudos demonstraram um perfil de suscetibilidade frente a cepas de micoses dermatológicas (CHAVES et al., 2020; COSTA et al., 2021). Além disso, o clioquinol demonstrou sinergismo a alguns fármacos, com a terbinafina, voriconazol e ciclopirox para isolados de ceratite fúngica, ornicomicose e dermatofitose. Em um estudo com *Fusarium* sp. isolados de ceratite fúngica humana, as associações de clioquinol com voriconazol, ou com ciclopirox olamina mostraram atividade fungicida após 24 horas de exposição ao patógeno e diferiram significativamente quando comparadas aos agentes antifúngicos isolados, sendo que o clioquinol, apresentou ação antibiofilme após 4 horas (CHAVES et al., 2020; COSTA et al., 2021).

A toxicidade do clioquinol foi estudada por alguns autores, em que demonstrou não ser irritativo a membrana corio-alantoide sozinho ou em combinação ao voriconazol, terbinafina ou ciclopirox olamina, de mesmo modo, apresentou baixa toxicidade a leucócitos humanos (CHAVES et al., 2020; COSTA et al., 2021).

### 3.2.6 Nitroxolina

A nitroxolina (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) é um derivado da 8-hidroxiquinolina, com peso molecular 190.156 g/mol (Figura 11). Possui ação contra bactérias *Gram* positivas e negativas estabelecida, sendo convencionalmente utilizada desde 1960 para tratamento de infecções do trato urinário (WYKOWSKI; FUENTEFRIA; DE ANDRADE, 2022). Após 10 anos de uso, a falta de conhecimento acerca da farmacocinética e espectro de ação limitou o uso deste fármaco. Acredita-se que o mecanismo de ação, se dê pela capacidade de quelar íons. Assim como o clioquinol, este é um fármaco versátil, mostrando potencial para o tratamento de diversas doenças como ação antiangiogênica, neuroprotetora, oncológica e antiparasitárias (SOBKE et al., 2018;

WYKOWSKI; FUENTEFRIA; DE ANDRADE, 2022).

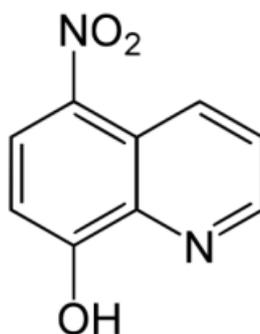


Figura 11. Estrutura química da nitroxolina..

A ação antifúngica da nitroxolina vem sendo explorada por alguns autores, demonstrando resultados promissores, como para as cepas de *Candida auris* (CIM 0,125 a 1mg/mL), uma espécie emergente que vem preocupando a classe médica devido à comorbidade e multirresistência aos antifúngicos disponíveis (FUCHS et al., 2021). Essa molécula, demonstrou ter ótimas ação frente a *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans* (CIM 42.07  $\mu$ M), do mesmo modo, em outro estudo que avaliou diferente espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, que foram encontrados valores de CIM entre 1-4mg/L (KRANZ et al., 2017). Em um estudo *in vitro* que avaliou 186 cepas de *Candida* spp., a nitroxolina (MIC 0.25-2 $\mu$ g/mL) mostrou ser superior aos imidazóis e semelhante a anfotericina B (HERNÁNDEZ MOLINA; LLOSÁ; VENTOSA, 1991).

### 3.3 Modelos experimentais *ex vivo* na oftalmologia

Historicamente vivenciamos tristes episódios do efeito deletério de medicamentos e cosméticos à população após a comercialização de compostos sem a devida compreensão dos potenciais toxicológicos. Com este ímpeto, desde 1944, a pesquisa de toxicologia ocular é fortemente baseada no teste de Draize (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944). A pesar da sua vasta aplicação, esse método vem sendo refutado tanto pela comunidade científica, quanto pela sociedade comum, devido ao seu impacto ao bem estar animal, muitas vezes tido como uma metodologia cruel e com baixa acurácia (STEILING et al., 1999). Dada a importância deste ponto, organizações mundiais estão se posicionando frente ao desacordo às pesquisas *in vivo*. O parlamento

européu há décadas estabelece requisitos para minimizar ou abolir o uso de animais na pesquisa (“REGULAMENTO (UE) 2019/1010 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO”, 2019). Em 2016, a ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Inc.) formulou diretrizes para a desenvolvimento ético do uso de animais na pesquisa oftalmológica, baseadas no conceito dos 3R’s (MACARTHUR CLARK, 2018; PIPER et al., 2023; “*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*”, 2023) e mais recentemente, o FDA (Food and Drug Administration) regulamentou a liberação de novos medicamentos sem a necessidade de testagem em animais (WADMAN, 2023). No Brasil, desde 2015, os modelos alternativos foram aprovados para a liberação de medicamentos, enquanto que para a pesquisa de produtos cosméticos, os estudos *in vivo* estão proibidos (PEREIRA, 2015; “Projeto de Lei da Câmara nº 70, de 2014”, 2014).

Diante deste cenário, vem crescendo a busca por desenvolvimento de modelos alternativos para a pesquisa oftalmológica. Dentre eles, as metodologias *ex vivo*, que consistem em reproduzir as condições reais de um fragmento de tecido ou órgão (MACIEL QUATRIN et al., 2019). Já foram desenvolvidas diferentes metodologias *ex vivo* para uma gama de afecções e sistemas oftálmicos (GÓMEZ-SEGURA et al., 2020; MINELLA et al., 2021; STOCKINGER et al., 2021; MARQUES et al., 2022; SAFA et al., 2022).

Ao longo destes quase 80 anos de aplicação do ultrapassado teste de Draize, diversas metodologias alternativas para a avaliação de toxicidade ocular vem sendo aplicadas, tais como, o teste em membrana corio-alantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) (SCHEEL et al., 2011; STEILING et al., 1999), teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP)(DUKIC; ALIX; SINA, 1992; UBELS et al., 2002), citotoxicidade a partir de cultura celular de tecidos oculares(NORTH-ROOT et al., 1982; SHOPSIS; ENG, 1985; LAGARTO et al., 2006a), teste em olho enucleado de galinha (PRINSEN et al., 2017), ensaio de captação do vermelho neutro (LAGARTO et al., 2006a), ensaio de quantificação de proteínas totais (SHOPSIS; ENG, 1985).

Ensaio *ex vivo* de micoses superficiais e profundas foram amplamente descritos, como modelos para ornicomicoses, micoses de pele e de mucosas oral, vaginal e intestinal, sistema respiratório e infecções sistêmicas. Do mesmo modo, cresce a busca para testes alternativos *ex vivo* para doenças infecciosas e micoses oculares. (MARLO et al., 2017; MAURIN et al., 2022; OKUROWSKA et al., 2020;

PENG et al., 2022)

#### 3.4.1 Modelo experimental *ex vivo* para ceratite infecciosa

Devido à delicadeza e complexidade dos tecidos oculares, são poucos os procedimentos que não impliquem em sofrimento ou comprometimento de suas funções, principalmente quando se trata da pesquisa de processos infecciosos, e é por isso que a pesquisa experimental para infecções fúngicas vem caminhando para o desenvolvimento de modelos alternativos (QUATRIN et al., 2019).

Modelos de ceratite infecciosa já foram descritos com olhos de ratos, coelhos, humanos, cabras, porcos (PINNOCK et al., 2017; MADHU et al., 2018; MONTGOMERY; FULLER, 2020; OKUROWSKA et al., 2020; UBANI-UKOMA et al., 2020). Um único estudo de modelo experimental *ex vivo* com córnea equina foi descrito, porém como um modelo genérico de pesquisa, não sendo especificamente para ceratites infecciosas. Neste estudo, foram comparadas duas técnicas, uma em imersão da córnea em um meio de cultura e em um sistema de interface ar/líquido (MARLO et al., 2017).

Tendo em vista a eficiente proteção da barreira epitelial da córnea, é consenso entre os métodos descritos para infecções a remoção desta primeira camada, afim de construir uma porta de entrada para a infecção, por incisão com uma lâmina de bisturi (MADHU et al., 2018), inoculação intraestromal com agulha (PINNOCK et al., 2017) ou trépano (UBANI-UKOMA et al., 2020). Não houve diferença na comparação do método de incisão e inoculação com agulha (PINNOCK et al., 2017).

A concentração de solução de inóculo inicial, varia entre os autores, em um estudo em córneas de coelho e humanas, foi instilado  $10^8$  UFC/mL iniciais para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans* e *F. solani* (PINNOCK et al., 2017). *Uhani-ukoma et al. (2020)* desenvolveu um método para ceratite bacteriana, inoculando  $1\mu\text{L}$  de uma solução de  $10^8$  UFC/mL por córnea de coelho. Em um modelo que avaliou a infecção de *P. aeruginosa* e *F. solani* em córneas caprinas, foi utilizado uma alça estéril  $932 \pm 46$  *F. solani*. Também já descrito anteriormente, volumes maiores,  $50\mu\text{L}$  de  $10^5$  UFC/mL de *C. albicans*, foram inoculados em córnea de coelho (BLANCO et al., 2017). Em experimentos *in vivo* em roedores, a concentração inicial do inóculo variou de  $10^5$  a  $10^8$  para *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. (MONTGOMERY; FULLER, 2020).

Ao desenvolver um experimento *ex vivo* é importante manter as estruturas o mais próximo do que são *in vivo*. A curvatura da córnea e a disposição de todas as suas camadas dentro da sua conformação habitual é de suma importância para a correta mimetização do efeito patológico. Para este feito, alguns autores sugerem diferentes metodologias, como aparatos como anéis metálicos (PINNOCK et al., 2017) ou plásticos (MARLO et al., 2017), ágar (PINNOCK et al., 2017; UBANI-UKOMA et al., 2020) ou um suporte de parafina previamente montado (MADHU et al., 2018).

As pesquisas *ex vivo* para infecções oculares ainda são incipientes e necessitam ser mais bem exploradas.

## 8 REFERÊNCIAS

ANVISA. **CONSULTA/MEDICAMENTOS**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>>. Acesso em: 24 abr. 2023.

ARORA, R. et al. Voriconazole versus natamycin as primary treatment in fungal corneal ulcers: Voriconazole and fungal keratitis. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 39, n. 5, p. 434–440, jul. 2011.

AUGUSTEYN, R. C.; MOHAMED, A. Biometry of the human cornea and globe: An evaluation by age, gender and population. **Experimental Eye Research**, v. 216, p. 108932, mar. 2022.

BAKKEN, I. M. et al. The use of in vivo confocal microscopy in fungal keratitis – Progress and challenges. **The Ocular Surface**, v. 24, p. 103–118, abr. 2022.

BARSOTTI, G. et al. Occurrence of Fungi from Conjunctiva of Healthy Horses in Tuscany, Italy. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 8, p. 903–906, nov. 2006.

BEHRENS-BAUMANN, W. J. et al. Keratomycosis due to *Tintelnotia destructans* refractory to common therapy treated successfully with systemic and local terbinafine in combination with polyhexamethylene biguanide. **International Ophthalmology**, v. 39, n. 6, p. 1379–1385, 15 jun. 2019.

BERKOWSKI, W. M. et al. Equine ulcerative keratitis with furrow: A review of the outcomes of 72 cases from 1987 to 2015. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 749–755, nov. 2019a.

BERKOWSKI, W. M. et al. Equine ulcerative keratitis with furrow: A review of the outcomes of 72 cases from 1987 to 2015. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 749–755, nov. 2019b.

BERMÚDEZ-JIMÉNEZ, E.; CALDERÓN-HERNÁNDEZ, A. Fungal keratitis in a mare: case report in Costa Rica. **Ciencias Veterinarias**, v. 38, n. 2, p. 30–42, 1 jul. 2020.

BETBEZE, C. M. et al. In vitro fungistatic and fungicidal activities of silver sulfadiazine and natamycin on pathogenic fungi isolated from horses with keratomycosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 10, p. 1788–1793, out. 2006.

BEZERRA, F. M.; HÖFLING-LIMA, A. L.; OLIVEIRA, L. A. DE. Fungal keratitis management in a referral cornea center in Brazil. **Revista Brasileira de**

**Oftalmologia**, v. 79, n. 5, 2020.

BLANCHARD, A.; BARR, E. M.; GILGER, B. C. Evaluation of equine corneal disease using spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT).

**Veterinary Ophthalmology**, v. 22, n. 6, p. 791–798, nov. 2019.

BLANCO, A. R. et al. Efficacy of a Fixed Combination of Tetracycline, Chloramphenicol, and Colistimethate Sodium for Treatment of *Candida albicans* Keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 10, p. 4292, 28 ago. 2017.

BORRONI, D. et al. Shotgun metagenomic sequencing in culture negative microbial keratitis. **European Journal of Ophthalmology**, p. 112067212211490, 8 jan. 2023.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Biofilms of *Candida* spp. from the ocular conjunctiva of horses with reduced azole susceptibility: a complicating factor for the treatment of keratomycosis? **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, n. 6, p. 539–546, nov. 2017.

BROOKS, D. et al. Antimicrobial susceptibility patterns of fungi isolated from horses with ulcerative keratomycosis. v. 59, n. 2, p. 138, 1998.

BROOKS, D. E.; ANDREW, S. E.; NASISSE, M. P. Comments regarding retrospective study on horses with fungal keratitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 5, p. 603–604, 1 set. 1998.

BROOKS, D.; GALERA. Optimal management of equine keratomycosis. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, p. 7, mar. 2012.

BROWN, L. et al. The global incidence and diagnosis of fungal keratitis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. e49–e57, mar. 2021.

CHANDASANA, H. et al. Corneal targeted nanoparticles for sustained natamycin delivery and their PK/PD indices: An approach to reduce dose and dosing frequency. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 317–325, dez. 2014.

CHAVES, M. A. et al. Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. **Mycoses**, v. 63, n. 10, p. 1069–1082, out. 2020.

CHEN, Y. et al. Experimental study on cryotherapy for fungal corneal ulcer. **BMC Ophthalmology**, v. 15, n. 1, p. 29, dez. 2015.

COSTA, B. et al. Evaluation of activity and toxicity of combining clioquinol

with ciclopirox and terbinafine in alternative models of dermatophytosis. **Mycoses**, v. 64, n. 7, p. 727–733, jul. 2021.

CULLEN ID, M. et al. Multi-locus DNA sequence analysis, antifungal agent susceptibility, and fungal keratitis outcome in horses from Southeastern United States. v. 14, n. 3, 2019.

DE LINDE HENRIKSEN, M. et al. Equine deep stromal abscesses (51 cases - 2004-2009) - Part 1: the clinical aspects with attention to the duration of the corneal disease, treatment history, clinical appearance, and microbiology results. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, p. 6–13, jul. 2014.

DE PAIVA, C. S.; ST. LEGER, A. J.; CASPI, R. R. Mucosal immunology of the ocular surface. **Mucosal Immunology**, v. 15, n. 6, p. 1143–1157, nov. 2022.

DEORUKHKARL, S.; KATIYARL, R.; SAINIL, S. Epidemiological features and laboratory results of bacterial and fungal keratitis: a five-year study at a rural tertiary-care hospital in western Maharashtra, India. v. 53, n. 4, p. 264, 2012.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. METHODS FOR THE STUDY OF IRRITATION AND TOXICITY OF SUBSTANCES APPLIED TOPICALLY TO THE SKIN AND MUCOUS MEMBRANES. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 377, 1 nov. 1944.

DUBIELZIG, R. R. et al. **Veterinary Ocular Pathology E-Book: a Comparative Review**. [s.l.] Saunders Ltd., 2010.

DUKIC, M.; ALIX, D.; SINA, F. Bovine Cornea1 Opacity and Permeability Test: An in Vitro Assay of Ocular Irritancy'. v. 18, n. 3, p. 442–449, 1992.

FERRER, C.; ALIÓ, J. L. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. Ten years of experience. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v. 1, n. 1, p. 15–22, mar. 2011.

FUCHS, F. et al. Antifungal activity of nitroxoline against *Candida auris* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 11, p. 1697.e7-1697.e10, 1 nov. 2021.

GELATT, K. N. (ED.). **Veterinary ophthalmology**. Sixth edition ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2020.

GÓMEZ-SEGURA, L. et al. Ex Vivo Permeation of Carprofen Vehiculated by PLGA Nanoparticles through Porcine Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues. **Nanomaterials**, v. 10, n. 2, p. 355, 18 fev. 2020.

GUBERT MÜLLER, G.; KARA-JOSÉ, N.; SILVESTRE DE CASTRO, R.

Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração Antifungals in eye infections: drugs and routes of administration. v. 72, n. 2, 2013.

**Guidelines for the Management of at Corneal Ulcer.** World Health Organization Regional Office for South-East Asia SEA/Ophthal/, , 2004.

HEDENGRAN, A.; KOLKO, M. Controversial preservation of eye drops: the toxicity of benzalkonium chloride. **Adverse Drug Reaction Bulletin**, v. 338, n. 1, p. 1311–1314, fev. 2023.

HERMANS, H. et al. EQUINE KERATOMYCOSIS IN THE NETHERLANDS FROM 2007 TO 2017 (28 CASES). 2017.

HERNÁNDEZ MOLINA, J. M.; LLOSÁ, J.; VENTOSA, A. In vitro activity of nitroxoline against clinical isolates of *Candida* species. **Mycoses**, v. 34, n. 7–8, p. 323–325, ago. 1991.

HOFFMAN, J. J.; BURTON, M. J.; LECK, A. Mycotic keratitis—a global threat from the filamentous fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, 1 abr. 2021.

HUNG, N. et al. Using Slit-Lamp Images for Deep Learning-Based Identification of Bacterial and Fungal Keratitis: Model Development and Validation with Different Convolutional Neural Networks. **Diagnostics**, v. 11, n. 7, p. 1246, 12 jul. 2021.

**ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method.** , 2010. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/protocols/ivocular-hetcam.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2023

JACOBUS BERLITZ, S. et al. Development of a Cloiquinol Nanocarrier as a New, Promising Option for the Treatment of Dermatocycosis. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 531, 4 fev. 2023.

KALAVATHY, C. M. et al. Comparison of Topical Itraconazole 1% With Topical Natamycin 5% for the Treatment of Filamentous Fungal Keratitis. **Cornea**, v. 24, n. 4, p. 449–452, maio 2005.

KRANZ, J. et al. The revival of old antibiotics for treatment of uncomplicated urinary tract infections in the era of antibiotic stewardship. **Current Opinion in Urology**, v. 27, n. 2, p. 127–132, mar. 2017.

KUMAR, A. et al. Causative fungi and treatment outcome of dematiaceous fungal keratitis in North India. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 67, n. 7, p. 1048, 2019.

KUO, M.-T. et al. An Omics Approach to Diagnosing or Investigating Fungal Keratitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3631, 25 jul. 2019.

KUO, M.-T. et al. A deep learning approach in diagnosing fungal keratitis based on corneal photographs. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14424, 2 set. 2020.

LAGARTO, A. et al. Comparative study of red blood cell method in rat and calves blood as alternatives of Draize eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 4, p. 529–533, jun. 2006a.

LAGARTO, A. et al. In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 5, p. 699–702, ago. 2006b.

LAVER, N. M. V. Ocular cytology: Diagnostic features and ongoing practices. **Cancer Cytopathology**, v. 129, n. 6, p. 419–431, jun. 2021.

LECK, A. Taking a corneal scrape and making a diagnosis. v. 22, n. 71, dez. 2009.

LEDBETTER, E. C. et al. In vitro susceptibility patterns of fungi associated with keratomycosis in horses of the northeastern United States: 68 cases (1987-2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 7, p. 1086–1091, 1 out. 2007.

LEDBETTER, E. C. et al. In vivo confocal microscopy for the detection of canine fungal keratitis and monitoring of therapeutic response. 2015.

LEDBETTER, E. C. Antifungal Therapy in Equine Ocular Mycotic Infections. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 33, n. 3, p. 583–605, 1 dez. 2017.

LEONARDELLI, F. et al. *In Vitro* Activity of Combinations of Zinc Chelators with Amphotericin B and Posaconazole against Six Mucorales Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. e00266-19, maio 2019.

LIANG, Q. et al. Effect of topical application of terbinafine on fungal keratitis. **Chinese Medical Journals Publishing House Co., Ltd.**, v. 12, n. 16, p. 1884–1888, 2009.

LOKMAN, B.; TUNDE, P. Promising Artificial Intelligence-Machine Learning-Deep Learning Algorithms in Ophthalmology. **Asia-Pacific Journal of Ophthalmology**, 2019.

MACARTHUR CLARK, J. The 3Rs in research: a contemporary approach

to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. s1, p. S1–S7, ago. 2018.

MACIEL QUATRIN, P. et al. Fungal infection models: Current progress of *ex vivo* methods. **Mycoses**, v. 62, n. 10, p. 860–873, out. 2019.

MADHU, S. et al. Ex vivo Caprine Model to Study Virulence Factors in Keratitis. **Journal of Ophthalmic & Vision Research**, v. 13, n. 4, p. 383, 1 out. 2018.

MAGGS, D. J.; MILLER, P. E.; OFRI, R. **Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology**. 6th edition ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018.

MAHMOUDI, S. et al. Fungal keratitis: An overview of clinical and laboratory aspects. **Mycoses**, v. 61, n. 12, p. 916–930, 1 dez. 2018.

MARLO, T. L. et al. Development of a novel *ex vivo* equine corneal model. **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, n. 4, p. 288–293, 1 jul. 2017.

MARQUES, J. H. et al. O Papel do Vítreo na Biomecânica Ocular. **Revista Sociedade Portuguesa de Oftalmologia**, p. 215- 222 Páginas, 30 dez. 2022.

MAURIN, C. et al. Exploration of the ocular surface infection by SARS-CoV-2 and implications for corneal donation: An *ex vivo* study. **PLOS Medicine**, v. 19, n. 3, p. e1003922, 1 mar. 2022.

MINELLA, A. L. et al. Validation and comparison of four handheld tonometers in normal *ex vivo* canine eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v. 24, n. S1, p. 162–170, mar. 2021.

MOBARAKI, M. et al. Biodegradable Nanoparticle for Cornea Drug Delivery: Focus Review. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 12, p. 1232, 18 dez. 2020.

MONTGOMERY, M. L.; FULLER, K. K. Experimental Models for Fungal Keratitis: An Overview of Principles and Protocols. **Cells**, v. 9, n. 7, 16 jul. 2020.

MOSHTAGHION, S. M. et al. Diagnostic accuracy of confocal scan in detecting *acanthamoeba* keratitis and fungal keratitis: a systematic review and meta-analysis. **International Ophthalmology**, 28 mar. 2023.

MUSTIKKA, M. P.; GRÖNTHAL, T. S. C.; PIETILÄ, E. M. Equine infectious keratitis in Finland: Associated microbial isolates and susceptibility profiles. **Veterinary Ophthalmology**, v. 23, n. 1, p. 148–159, jan. 2020.

**Natamicyn**  [s.d.]. Disponível em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/050514s009lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050514s009lbl.pdf)>.

Acesso em: 23 abr. 2023

NEJABAT, M. et al. Therapeutic Effect of Intrastromal Voriconazole, Topical

Voriconazole, and Topical Natamycin on Fusarium Keratitis in Rabbit. **Journal of Ophthalmology**, v. 2016, p. 8692830, 19 maio 2016.

NORTH-ROOT, H. et al. Evaluation of an in vitro cell toxicity test using rabbit corneal cells to predict the eye irritation potential of surfactants. **Toxicology Letters**, v. 14, n. 3–4, p. 207–212, dez. 1982.

OKE, I.; VANDERVEEN, D. Machine Learning Applications in Pediatric Ophthalmology: AUTHORS. **Seminars in Ophthalmology**, v. 36, n. 4, p. 210–217, 19 maio 2021.

OKUROWSKA, K. et al. Establishing a Porcine Ex Vivo Cornea Model for Studying Drug Treatments against Bacterial Keratitis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 159, p. 61156, 12 maio 2020.

OLIVEIRA, A. G. L. DE et al. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. v. 71, n. 1, p. 153– 59., 2012.

OLIVEIRA, M. A. et al. Anterior Segment Optical Coherence Tomography in the Early Management of Microbial Keratitis: A Cross-Sectional Study. **Acta Médica Portuguesa**, v. 33, n. 5, p. 318–325, 4 maio 2020.

OYAMA, T. M. et al. Clotrimazole-induced increase and decrease in the intracellular Zn<sup>2+</sup> level in rat thymocytes. **Life Sciences**, v. 91, n. 23–24, p. 1216–1220, dez. 2012.

PATIL, A.; LAKHANI, P.; MAJUMDAR, S. Current perspectives on natamycin in ocular fungal infections. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 206–212, out. 2017.

PEARCE, J. W. et al. In vitro susceptibility patterns of *Aspergillus* and *Fusarium* species isolated from equine ulcerative keratomycosis cases in the midwestern and southern United States with inclusion of the new antifungal agent voriconazole. 2009.

PENG, M. et al. An ex vivo model of human corneal rim perfusion organ culture. **Experimental Eye Research**, v. 214, p. 108891, jan. 2022.

PEREIRA, P. R. T. RDC 35/2015. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC N° 35, DE 7 DE AGOSTO DE 2015. . 7 ago. 2015.

PINNOCK, A. et al. Ex vivo rabbit and human corneas as models for bacterial and fungal keratitis. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2016 255:2**, v. 255, n. 2, p. 333–342, 14 nov. 2017.

PIPER, S. K. et al. Statistical review of animal trials—A guideline. **Biometrical Journal**, v. 65, n. 2, p. 2200061, fev. 2023.

PIPPI, B. et al. Clotrimazol is a promising preventive morphological switching compound in the treatment of *Candida* infections linked to the use of intrauterine devices. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 1655–1663, 1 nov. 2018.

PIPPI, B. et al. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 1, p. 41–48, jan. 2019a.

PIPPI, B. et al. Oral clotrimazol is effective in the treatment of a fly model of *Candida* systemic infection. **Mycoses**, v. 62, n. 5, p. 475–481, maio 2019b.

PRADHAN, L. et al. Natamycin in the treatment of keratomycosis: Correlation of treatment outcome and in vitro susceptibility of fungal isolates. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 59, n. 6, p. 512, 2011.

PRAJNA, N. V. et al. The Mycotic Ulcer Treatment Trial: A Randomized Trial Comparing Natamycin vs Voriconazole. **JAMA Ophthalmology**, v. 131, n. 4, p. 422, 1 abr. 2013.

PRAJNA, N. V. et al. Effect of Oral Voriconazole on Fungal Keratitis in the Mycotic Ulcer Treatment Trial II (MUTT II): A Randomized Clinical Trial. **JAMA Ophthalmology**, v. 134, n. 12, p. 1365, 1 dez. 2016.

PRINSEN, M. K. et al. The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 132–149, abr. 2017.

Projeto de Lei da Câmara nº 70, de 2014. PL6602/2013. . 2014.

REGULAMENTO (UE) 2019/1010 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. . 5 jun. 2019, p. L 170/115.

RIBEIRO, A. C. et al. Farmácia clínica: transformação do profissional farmacêutico. **Revista Científica do UBM**, p. 112–123, 19 dez. 2021.

RODRIGUEZ GALARZA, R. M.; MCMULLEN, R. J. Descemet's membrane detachments, ruptures, and separations in ten adult horses: Clinical signs, diagnostics, treatment options, and preliminary results. **Veterinary Ophthalmology**, v. 23, n. 4, p. 611–623, jul. 2020.

ROSA, M. et al. Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, n. 1, p. 51–55, mar. 2003.

SAFA, B. N. et al. Glaucoma and biomechanics. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 33, n. 2, p. 80–90, mar. 2022.

SAFATE, ANGÉLICA DE MENDONÇA VAZ; GALERA, P. **OFTALMOLOGIA VETERINÁRIA - CLÍNICA E CIRURGIA**. 1. ed. [s.l.] Playa, 2023.

SAHAY, P. et al. Pharmacologic therapy of mycotic keratitis. **Survey of Ophthalmology**, v. 64, n. 3, p. 380–400, 1 maio 2019.

SAID, D. G. et al. Collagen Cross-Linking with Photoactivated Riboflavin (PACK-CXL) for the Treatment of Advanced Infectious Keratitis with Corneal Melting. **Ophthalmology**, v. 121, n. 7, p. 1377–1382, jul. 2014.

SAINI, J. S. et al. Neural network approach to classify infective keratitis. **Current Eye Research**, v. 27, n. 2, p. 111–116, jan. 2003.

SANSOM, J.; FEATHERSTONE, H.; BARNETT, K. C. Keratomycosis in six horses in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 156, n. 1, p. 13–17, jan. 2005.

SAVITRI SHARMA et al. Re-appraisal of topical 1% voriconazole and 5% natamycin in the treatment of fungal keratitis in a randomised trial. **British Journal of Ophthalmology**, v. 99, n. 9, p. 1190, 1 set. 2015.

SCHEEL, J. et al. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 471–492, abr. 2011.

SHAH, A. et al. Geographic variations in microbial keratitis: an analysis of the peer-reviewed literature. **British Journal of Ophthalmology**, v. 95, n. 6, p. 762–767, 1 jun. 2011.

SHARMA, N. et al. Fungal keratitis: A review of clinical presentations, treatment strategies and outcomes. **The Ocular Surface**, v. 24, p. 22–30, abr. 2022.

SHERMAN, A. B. et al. Impact of fungal species cultured on outcome in horses with fungal keratitis. 2016.

SHIVAJI, S. et al. The Human Ocular Surface Fungal Microbiome. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 60, n. 1, p. 451, 31 jan. 2019.

SHOPPIS, C.; ENG, B. Rapid cytotoxicity testing using a semi-automated protein determination on cultured cells. **Toxicology Letters**, v. 26, n. 1, p. 1–8, jul. 1985.

SMITH, K. M.; PUCKET, J. D.; GILMOUR, M. A. Treatment of six cases of equine corneal stromal abscessation with intracorneal injection of 5% voriconazole solution. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, n. SUPPL.1, p. 179–185, 2014.

SOBKE, A. et al. Empirical treatment of lower urinary tract infections in the face of spreading multidrug resistance: in vitro study on the effectiveness of nitroxoline.

**International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 2, p. 213–220, fev. 2018.

SOUSA, M. E. DE et al. Fungal microbiota from ocular conjunctiva of clinically healthy horses belonging to the Military Police Cavalry of Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1151–1155, set. 2011.

**Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Association for Research in Vision and Ophthalmology**, 21 fev. 2023. Disponível em: <<https://www.arvo.org/About/policies/statement-for-the-use-of-animals-in-ophthalmic-and-vision-research/#two>>. Acesso em: 21 fev. 2023

STEILING, W. et al. The HET–CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicology in Vitro**, v. 13, n. 2, p. 375–384, abr. 1999.

STOCKINGER, P. et al. Correlation of in vivo/ex vivo imaging of the posterior eye segment. **Der Ophthalmologe**, v. 118, n. S2, p. 153–159, jul. 2021.

STRUYK, A. P. et al. Pimaricin, a new antifungal antibiotic. p. 878–885, 1958.

SUN, Y. et al. Corneal Debridement Combined with Intrastromal Voriconazole for Recalcitrant Fungal Keratitis. **Journal of Ophthalmology**, v. 2018, p. 1–8, 2018.

TABATABAEI, S. A. et al. The use of in vivo confocal microscopy to track treatment success in fungal keratitis and to differentiate between *Fusarium* and *Aspergillus* keratitis. **International Ophthalmology**, v. 40, n. 2, p. 483–491, fev. 2020.

TAMURA, N. et al. Utility of systemic voriconazole in equine keratomycosis based on pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of tear fluid following oral administration. 2020a.

TAMURA, N. et al. Utility of systemic voriconazole in equine keratomycosis based on pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of tear fluid following oral administration. **Veterinary Ophthalmology**, v. 23, n. 4, p. 640–647, 1 jul. 2020b.

TING, D. S. J. et al. Diagnostic armamentarium of infectious keratitis: A comprehensive review. **The Ocular Surface**, v. 23, p. 27–39, jan. 2022.

UBANI-UKOMA, U. et al. An ex vivo cornea infection model. **MethodsX**, v. 7, 1 jan. 2020.

UBELS, J. L. et al. A redesigned corneal holder for the bovine cornea opacity and permeability assay that maintains normal corneal morphology. **Toxicology in Vitro**, v. 16, n. 5, p. 621–628, out. 2002.

UDDARAJU, M. et al. Corneal Cross-linking as an Adjuvant Therapy in the Management of Recalcitrant Deep Stromal Fungal Keratitis: A Randomized Trial. **American Journal of Ophthalmology**, v. 160, n. 1, p. 131- 134.e5, jul. 2015.

VANATHI, M. et al. Evaluation of antifungal susceptibility and clinical characteristics in fungal keratitis in a tertiary care center in North India. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 70, n. 12, p. 4270, 2022.

VENKATESH N PRAJNA et al. Natamycin and voriconazole in *Fusarium* and *Aspergillus* keratitis: subgroup analysis of a randomised controlled trial. **British Journal of Ophthalmology**, v. 96, n. 11, p. 1440, 1 nov. 2012.

VOELTER-RATSON, K. et al. Equine keratomycosis in Switzerland: A retrospective evaluation of 35 horses (January 2000-August 2011). **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 5, p. 608–612, set. 2013.

WADA, S. et al. Equine keratomycosis in Japan. **Veterinary Ophthalmology**, v. 16, n. 1, p. 1–9, jan. 2013.

WADMAN, M. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. **Science**, v. 379, n. 6628, p. 127–128, 13 jan. 2023.

WALSH, M. L. et al. Evaluation of the ocular surface mycobiota in clinically normal horses. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0246537, 4 fev. 2021.

WANG, Q. et al. Cyclodextrin-based ocular drug delivery systems: A comprehensive review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 476, p. 214919, fev. 2023a.

WANG, W. et al. Diagnosis of fungal keratitis caused by *Nectria haematococca* through next-generation sequencing: review of literature and report of three cases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 131, p. 53–56, jun. 2023b.

WANG, Y. et al. Characterization of fungal microbiota on normal ocular surface of humans. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 1, p. 123.e9-123.e13, jan. 2020.

WANG, Y. E. et al. Role of in vivo confocal microscopy in the diagnosis of infectious keratitis. **International Ophthalmology**, v. 39, n. 12, p. 2865–2874, dez. 2019.

WEI, Z. et al. Development and multi-center validation of machine learning model for early detection of fungal keratitis. **eBioMedicine**, v. 88, p. 104438, fev. 2023.

WHITMAN, R. E. et al. What is your diagnosis? Corneal scrape cytology from a horse. **Veterinary Clinical Pathology**, p. vcp.13077, 20 abr. 2022.

WYKOWSKI, R.; FUENTEFRIA, A. M.; DE ANDRADE, S. F. Antimicrobial activity of clioquinol and nitroxoline: a scoping review. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, p. 535, ago. 2022.

YAN, C. et al. Clioquinol induces G2/M cell cycle arrest through the up-regulation of TDH3 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Research**, v. 214, p. 1–7, set. 2018.

ZHANG, W. et al. Use of Potassium Hydroxide, Giemsa and Calcofluor White Staining Techniques in the Microscopic Evaluation of Corneal Scrapings for Diagnosis of Fungal Keratitis. **Journal of International Medical Research**, v. 38, n. 6, p. 1961–1967, dez. 2010.

ZHAO, P. S. et al. Comparison of Central Corneal Thickness Measurements by Visante Anterior Segment Optical Coherence Tomography With Ultrasound Pachymetry. v. 143, n. 6, jun. 2007.