

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**SUSCEPTIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* *IN VITRO* E  
*IN VIVO* FRENTE À ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS  
ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**FRANCIELLI PANTELLA KUNZ DE JESUS**

**Porto Alegre, RS, Brasil**

**2015**

**SUSCEPTIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* IN VITRO E  
IN VIVO FRENTE À ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS  
ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS**

**Francielli Pantella Kunz de Jesus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Medicina Veterinária Preventiva e Patologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Veterinárias**.

**Orientador: Prof. Dr. Laerte Ferreira  
Coorientador: Janio Moraes Santurio**

Porto Alegre, RS, Brasil  
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

A comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a tese de Doutorado

**SUSCEPTIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* IN VITRO E IN VIVO  
FRENTE A ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS  
E ANTIFÚNGICOS**

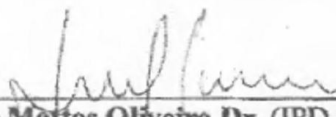
elaborada por  
**Francieli Pantella Kunz de Jesus**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Ciências Veterinárias**

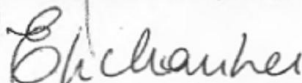
**COMISSÃO EXAMINADORA**



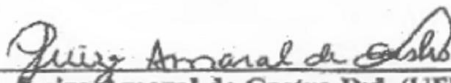
\_\_\_\_\_  
**Laerte Ferreira, Dr.**  
(Presidente/Orientador)



\_\_\_\_\_  
**Flávio de Mattos Oliveira Dr. (IPD-Santa Casa, POA)**



\_\_\_\_\_  
**Edna Maria Cavallini Sanches, Dr<sup>a</sup>. (UFMT)**



\_\_\_\_\_  
**Luiza Amaral de Castro Dr<sup>a</sup>. (UFRGS)**

Porto Alegre, 27 de março de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

KUNZ DE JESUS, FRANCIELLI PANTELLA  
SUSCEPTIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* IN VITRO E  
IN VIVO FRENTE À ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS  
ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS / FRANCIELLI PANTELLA  
KUNZ DE JESUS. -- 2015.  
117 f.

Orientador: LAERTE FERREIRO.  
Coorientador: JANIO MORAES SANTURIO.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2015.

1. *Pythium insidiosum*. 2. susceptibilidade. 3.  
antimicrobianos. 4. antifúngicos. 5. In vivo e In  
vitro. I. FERREIRO, LAERTE, orient. II. MORAES  
SANTURIO, JANIO, coorient. III. Título.

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

Dedico este trabalho aos meus colegas micologistas *Aline Ludwig, Érico S. Loreto; Janio M. Santurio, Juliana M. Tondolo, Karine S. Bizzi, Laerte Ferreira, Maiara B. Pilotto, Pedro H. Abib, Régis A. Zanette, Sydney H. Alves* que trabalharam arduamente, lado a lado nesta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter sempre colocado as pessoas certas em meu caminho e dado forças para lutar e nunca desistir, aumentando mais a Fé e a certeza de que o Bem sempre prevalecerá. A Nossa Senhora de Medianeira por mais essa graça alcançada.

Agradeço de todo o meu coração aos meus pais MARIZA ANGÉLICA KUNZ DE JESUS e NELSON SILVA DE JESUS, que constituíram uma família dentro de limitações financeiras, mas sempre com muito amor, perseverança, amizade e honestidade. E aos meus irmãos eternos amigos, Tiago, Diego, Thales e Pablo, suas esposas Alessandra, Lausiane, Raquel e Elenice e meus sobrinhos Estela e Lorenzo. Agradeço, ao meu esposo Adonir Lorensi, meu companheiro determinado, incansável e amoroso. E aos nossos filhos caninos que adotamos ao longo destes dez anos. Aos meus Avós, Sogros e demais familiares que contribuíram de alguma forma para o término de mais essa etapa. Agradeço em especial ao Pablo que sempre estava pronto a ajudar.

Agradeço, ao meu orientador Professor Laerte Ferreiro por seu exemplo de luta e perseverança diante das dificuldades. Aos meus coorientadores Janio M. Santurio e Sydney H. Alves por toda confiança e conhecimentos a mim conferidos.

Sou muito grata aos meus colegas e amigos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI-UFSM), Aline Ludwig, Maiara B. Pilloto, Karine S. Bizzi, Pedro H. Abib, Érico S. Loreto, Juliana M. Tondolo, Régis A. Zanette, Carla Weiblen, Maria I. Azevedo, Claudia Lautert, Marcela Arend, Fernanda MarKs, Franciele Chassot, Tarciele Venturine, Laura B. Denardin, Débora Mario, Carine Zimerman, Carmem Reis, por toda ajuda e carinho recebido.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e de qualidade. Ao CNPq pelo apoio financeiro dado a este trabalho. A CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o doutorado.

“A verdadeira CORAGEM é ir atrás de seus  
SONHOS mesmo quando todos dizem que  
ele é IMPOSSÍVEL.”

Cora Coralina

# RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUSCEPTIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* *IN VITRO* E *IN VIVO* FRENTE  
FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS ASSOCIADOS

AUTOR: FRANCIELLI PANTELLA KUNZ DE JESUS

ORIENTADOR: PROF. DR. LAERTE FERREIRO

Local e Data da Defesa: Porto Alegre, 27 de março de 2015

*Pythium insidiosum* é o oomiceto causador da pitiose uma doença de caráter crônico de difícil tratamento que acomete humanos e animais. Este microrganismo aquático semelhante aos fungos possui características distintas de parede celular e ausência de ergosterol na membrana celular, particularidades estas que dificultam o tratamento da doença com antifúngicos tradicionais. O presente estudo teve por objetivos: avaliar as interações sinérgicas das associações de antibacterianos, antifúngicos e compostos fenólicos sobre *P. insidiosum*; comparar, *in vivo* e *in vitro*, a monoterapia e combinação de azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina em coelhos com pitiose experimental. Para os testes *in vitro* de microdiluição em caldo foram utilizados 30 isolados de *P. insidiosum*, conforme o protocolo de M38-A2 do CLSI. Para os testes *in vivo*, os animais foram distribuídos nos grupos: Infectados com zoósporos de *P. insidiosum*, tratados com placebo (Controle positivo, n=6) e não infectados tratados com placebo (controle negativo, n=5), tratados com azitromicina; claritromicina; minociclina; e tigeciclina (n=6); e com as combinações minociclina com azitromicina; minociclina com claritromicina; minociclina com tigeciclina (n=6). Amostras de sangue, medidas da área da lesão, e tecidos foram coletados para análise antes, durante e ao término do tratamento. Índices mais elevados de sinergismo foram obtidos com a associação de claritromicina com micafungina (73,33%); minociclina com claritromicina ou azitromicina (93,33%); itraconazol com os compostos fenólicos timol ou carvacrol (96,60%) e minociclina com claritromicina, azitromicina (93,33%) ou tigeciclina (86,67%). Interações antagônicas das associações de timol ou carvacrol com



antibacterianos ou antifúngicos, e antibiótico com antibiótico, não foram observadas. Porém nas associações de antibacterianos com antifúngicos os percentuais mais altos foram vistos em claritromicina ou azitromicina com itraconazol (6,67%) e minociclina com caspofungina (6,67%). A completa regressão da pitiose foi comprovada pela queda nos níveis de anticorpos, regressão das lesões e negatividade nos testes de detecção de hifas em tecido: PCR, histopatologia e isolamento. Nos tratamentos *in vivo* todos os grupos diferiram do controle positivo. Cura clínica e completa regressão da lesão foram obtidos nos tratamentos com azitromicina (n=5/6), minociclina (n=1/6), azitromicina com minociclina (n=4/6), minociclina com claritromicina (n=1/6) e minociclina com tigeciclina (n=1/6). A comparação *in vitro* das associações de minociclina com azitromicina ou claritromicina (93,33%), e tigeciclina (86,67) revelou percentuais de sinergismo elevados, no entanto a correlação destes dados com o *in vivo* demonstra o cuidado na escolha da associação, pois claritromicina (93,33%) e tigeciclina (86,67%) mesmo apresentando altos índices de sinergismo com minociclina nos testes *in vivo* tiveram um baixo percentual de regressão das lesões (16,66%). Além disso, os tecidos coletados submetidos à análise molecular e histopatológica revelaram que a tigeciclina mesmo em associação com minociclina não foi capaz de conter a metástase da pitiose para os pulmões. A azitromicina em monoterapia demonstrou ser a melhor terapia para a regressão completa das lesões causadas pela pitiose.

**Palavras – chave:** *Pythium insidiosum*. susceptibilidade. antimicrobianos. antifungicos. *in vivo*. *In vitro*.

# ABSTRACT

Thesis of Doctorale  
Post- Graduate Program in Veterinary Medicine  
Federal University of Rio Grande of Sul, RS, Brazil

SUSCEPTIBILITY *Pythium insidiosum* *IN VITRO* AND *IN VIVO* FRONT OF DRUGS  
ASSOCIATION ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL  
AUTHOR: FRANCIELLI PANTELLA KUNZ DE JESUS  
ADVISOR: PROF. DR. LAERTE FERREIRO  
Place and Date: Porto Alegre, March 27<sup>th</sup>, 2015

*Pythium insidiosum* is the cause of the oomycete pythiosis one chronic nature of the disease is difficult to treat that affects humans and animals. This water organism similar to fungi has distinct characteristics of cell wall and absence of ergosterol in the cell membrane, these peculiarities that make it difficult to treat the disease with traditional antifungal agents. This study aimed to: assess the synergistic interactions of antibiotics associations, antifungal and phenolic compounds on *P. insidiosum*; comparison, *in vivo* and *in vitro*, monotherapy and combination of azithromycin, clarithromycin, tigecycline with minocycline in rabbits with pythiosis experimental. For testing *in vitro* broth microdilution were used 30 strains of *P. insidiosum* as the M38-A2 CLSI protocol. For tests *in vivo*, the animals were divided into groups: Infected with zoospores of *P. insidiosum* treated with placebo (positive control, n = 6) and uninfected treated with placebo (negative control, n = 5) treated with azithromycin; clarithromycin; minocycline and tigecycline (n = 6); and minocycline + azithromycin combinations; minocycline and clarithromycin; minocycline and tigecycline (n = 6). Blood samples, the lesion area of measures, and tissues were collected for analysis before, during and after treatment. Higher rates of synergism were obtained with the clarithromycin association with micafungin (73.33%); minocycline with clarithromycin or azithromycin (93.33%); itraconazole with phenolic compounds thymol or carvacrol (96.60%) and minocycline with clarithromycin or azithromycin (93.33%) and tigecycline (86.67%). Antagonistic interactions of thymol or carvacrol associations with antibiotics or antifungal and antibiotic and antibiotic, were observed. However, the associations with antifungal antibiotics the highest percentages were seen in

clarithromycin or azithromycin with itraconazole (6.67%) and minocycline with caspofungin (6.67%). The regression of lesions caused by pythiosis was confirmed by the fall in antibodies, regression of lesions and negativity in hyphae detection tests in tissue: PCR, histopathology and isolation. In treatments *in vivo* all groups differed from positive control. Clinical cure and complete regression of the lesion were obtained in the treatments with azithromycin (n = 5/6), minocycline (n = 1/6), azithromycin or minocycline (n = 4/6), clarithromycin and minocycline (n = 1/6) and tigecycline with minocycline (n = 1/6). *In vitro* comparisons of minocycline associations with azithromycin or clarithromycin (93.33%), and tigecycline (86.67) showed high percentages of synergism, however the correlation of these data with *in vivo* demonstrates the care in the association of choice, for clarithromycin (93.33%) and TIG (86.67%) even with high rates of synergism with minocycline *in vivo* tests had a low percentage of cure (16.66%). In addition, the collected tissues subjected to molecular and histological analysis revealed that even in tigecycline and tigecycline with minocycline association was not able to contain the disease metastasis to the lungs. The azithromycin monotherapy was shown to be the best therapy to the regression of lesions caused by pythiosis.

Keywords: *Pythium insidiosum*. Susceptibility. Antimicrobial. Antifungals *In vivo*. *In vitro*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Adenosina desaminase
ADP	Difosfato de adenosina
ALT	alanina aminotransferase
AND	Anidulafungina
AST	aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
AMB	Anfotericina B
AZT	Azitromicina
CEM	Concentração efetiva mínima
CIM	Concentração Inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CLT	Claritromicina
CSF	Caspofungina
CRV	Carvacrol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzima ligada a imuno absorvente
MCF	Micafungina
MIN	Minociclina
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IFN- $\gamma$	Gama-Interferon
ITS	Espaçador interno transcrito
ITZ	Itraconazol
NTPDase	Nucleosídeo trifosfato difofohidrolase
PAM	Peptídeo microbiano
PCR	Reação em cadeia polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribossômico
TRB	Terbinafina
TIG	Tigeciclina

TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
THY	Timol
VRZ	Voriconazol

## LISTA DE TABELAS

**Tabela1. Comparação da susceptibilidade de 30 isolados de *Pythium insidiosum* frente antifúngicos e antimicrobianos com dados obtidos na literatura.....81**

**Tabela2: Característica hematológicas e bioquímicas de coelhos com diminuição das lesões causadas por *Pythium insidiosum* tratados com azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina em monoterapia e terapia combinada.....82**

## **LISTA DE ANEXOS**

ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética.....	102
ANEXO B – Certificado de análise do carvacrol.....	103
ANEXO C – Certificado de análise do timol.....	104
ANEXO D – Metodologia.....	105

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
<b>2.1 Agente Etiológico</b> .....	<b>18</b>
2.1.1 <i>Pythium insidiosum</i> .....	18
2.1.2 Classificação do agente .....	18
2.1.3 Características morfológicas e ambientais.....	20
<b>2.2 Pitiose</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Epidemiologia .....	21
2.2.2 Patogenia.....	23
2.2.3 Pitiose em animais.....	25
2.2.4 Pitiose em humanos.....	26
2.2.5 Diagnóstico .....	27
2.2.6 Tratamento da pitiose .....	28
2.2.7 Modelos experimentais.....	31
<b>2.3 Fármacos</b> .....	<b>31</b>
2.3.1 Fármacos Antifúngicos.....	31
2.3.2 Fármacos Antibacterianos.....	32
2.3.3 Uso de antibacterianos frente a organismos fúngicos .....	33
2.3.4 Susceptibilidade da família <i>Pythiaceae</i> a antibacterianos .....	35
2.3.5 Atividade de Timol e Carvacrol frente a fungos patogênicos.....	37
2.3.6 Susceptibilidade do gênero <i>Pythium</i> frente a novos compostos .....	39
2.3.7 Atividade antifúngica de combinação de fármacos.....	40
<b>3.OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1 Gerais</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>43</b>
<b>4. ARTIGOS</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1 Artigo 1</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2 Artigo 2</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3 Artigo 3</b> .....	<b>58</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>83</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>85</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>104</b>



# 1. INTRODUÇÃO

*Pythium insidiosum* é um oomiceto, agente etiológico da pitiose, que acomete mamíferos e aves (DE COCK et al., 1987). A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos está retratada através de diferenças na parede e composição da membrana. A quitina, um componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, onde aparecem como componentes predominantes, celulose e  $\beta$ -glicana (GAASTRA et al., 2010). Também os oomicetos diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, nos primeiros ele não é sintetizado, sendo utilizado esteróides exógenos (GROOTERS, 2003). Estes fatos dificultam o tratamento da pitiose através de terapias antifúngicas, devido à maioria dos fármacos atuarem inibindo a síntese de ergosterol (SANTURIO et al., 2006; GROOTERS, 2003).

Diversos protocolos para o tratamento têm sido utilizados frente à pitiose, incluindo tratamento químico (antifúngicos), cirúrgico e de imunoterapia. A imunoterapia utilizando material derivado do crescimento micelial do oomiceto *P. insidiosum* têm sido uma alternativa terapêutica não invasiva, com resultados animadores no tratamento de lesões recentes causadas pelo oomiceto (SANTURIO; LEAL; MONTEIRO, 2003), a eficácia da imunoterapia é substancial, com cerca de 70% de cura em equinos e 55% em humanos (GAASTRA et al., 2010). A susceptibilidade do gênero *Pythium* a antibacterianos 70S ativos foi demonstrada com tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina e eritromicina, podendo apresentar mais de um mecanismo de ação (LEARY et al., 1982; MARCHANT & SMITH, 1968; RAWN; VAN ETTEN, 1978; TSAO, 1970; LORETO et al. 2011; MAHL et al., 2012; LORETO et al., 2014), sendo sensíveis a concentrações relativamente baixas. Além de antibacterianos, estudos relatam também atividade de compostos, com alto teor de timol e carvacrol, extraídos de plantas com ação anti-*Pythium* (SRIPHANA et al., 2013; SUTHIWONG et al., 2014; MAISSA; WALID, 2014; FONSECA et al., 2014).

Este estudo teve por objetivos, avaliar a susceptibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* a antibacterianos macrolídeos ou tetraciclina e timol ou carvacrol associados a antifúngicos e *in vivo* a monoterapia e terapia combinada de tetraciclina e macrolídeos.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Agente Etiológico

#### 2.1.1 *Pythium insidiosum*

A descrição de características fúngicas de um micro-organismo isolado de lesões de equinos na Índia, realizado por cientistas ingleses no final do século XIX, parece ser o primeiro relato de *Pythium insidiosum* (SMITH, 1884). Mais tarde, no início do século XX cientistas alemães realizaram os dois primeiros registros científicos do oomiceto, denominado *Hyphomyces destruens* (DE HAAN; HOOBKAMER 1901, WITKAMP, 1924). Pela ausência de esporulação Bridges e Emmons (1961), o denominaram de *Hyphomyces destruens*, baseado no nome sugerido anteriormente (DE HAAN e HOOBKAMER, 1901), a enfermidade então passou a se chamar ficomicose, devido a semelhanças com as micoses causadas por zigomicetos. Em 1974, observou-se que o micro-organismo na presença de meio líquido produzia zoósporos, onde foi classificado como um oomiceto da família *Pythiaceae*, dentro da ordem Peronosporales, denominado de *P. insidiosum*, dando origem ao termo pitiose (AUSTWICK; COPLAND, 1974).

A partir de então surgiram novos relatos e propostas de nomenclatura: *P. gracile* e *P. destruens* (ICHITANI; AMINIYA, 1980). Neste mesmo período, De Cock et al. (1987), analisaram amostras provenientes de lesões de humanos, equinos, cães e bovinos, e concluíram que se tratava da mesma espécie *P. insidiosum*.

#### 2.1.2 Classificação do agente

Estudos taxonômicos mais aprofundados, baseados em análises de sequenciamento de gene do RNA ribossomal de *P. insidiosum*, confirmaram que os membros da classe

Oomycetes são filogeneticamente distantes dos membros do Reino Fungi e estariam relacionados de maneira mais próxima das algas que dos fungos (ADHIKARI et al., 2013). A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos está retratada ao nível celular através de diferenças na parede e composição da membrana. A quitina e o ergosterol, componentes essenciais da parede e membrana celular fúngica, estão geralmente ausentes na parede celular dos oomicetos, onde aparecem como componentes predominantes a celulose e  $\beta$ -glicana (HENDRIX, 1964).

Estudos detalhados sobre a classificação dos fungos, baseados na sistemática filogenética e análises moleculares, entre outros, dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: Fungi, Stramenopila e Protista (De Cock et al., 1987). Baseado nessa nova classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao Reino Stramenipila, Classe Oomycetes (=Perenosporomycetes), Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e espécie *Pythium insidiosum* (DICK, 2001; GAASTRA et al., 2010). Das 250 espécies relatadas na literatura, apenas 50% são reconhecidas pela comunidade internacional, sendo estas divididas em 11 grupos filogenéticos (LEVESQUE; DE COCK, 2004). Estudos revelam que as espécies são geneticamente distintas e exibem variantes na distribuição, virulência e hospedeiros (JIANG; TYLER, 2012; ADHIKARI et al, 2013; KRAJAEJUN, 2014b).

Espécies de *Pythium* são a principal causa de doenças em plantas (“damping-off”, tombamento), ocasionando graves prejuízos em lavouras. Algumas espécies têm sido estudadas para utilização como controle biológico de fungos patógenos e larvas de mosquito, enquanto apenas a espécie *P. insidiosum* é conhecida como patógeno de mamíferos (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996, GAASTRA et al., 2010), embora Calvano et al. (2011), tenham reportado recentemente um caso de infecção invasiva, e agressiva de tecidos por *P. aphanidermatum* semelhante as lesões causadas por *P. insidiosum*, posterior a um ferimento de guerra em um soldado no Afeganistão. Há também o relato de uma cepa isolada de um cão na África que demonstra um padrão filogenético distinto do publicado por outros autores (RIVIERRE et al., 2005). Estas evidências podem indicar que mais de uma espécie podem estar envolvidas nas infecções causadas em mamíferos.

Schurko et al. (2003), ao compararem 28 espécies de *P. insidiosum* originárias das Américas, Ásia e Austrália, demonstraram haver grandes diferenças entre os isolados de *P. insidiosum* das 3 regiões estudadas com a possibilidade real de não serem todas a mesma espécie. Estes autores levantam a possibilidade de uma reclassificação como

sub-espécies, pois cada cluster dos isolados representa populações geneticamente distintas. Azevedo et al. (2012), ao estudarem isolados de diferentes regiões do Brasil, demonstraram que os isolados são similares entre si e dividem um único ancestral em comum, possivelmente da Ásia. Outro estudo realizado por Zanette et al. (2013a), observou diferenças fenotípicas na produção de exoenzimas, que diferem de isolados de diferentes agrupamentos.

### 2.1.3 Características morfológicas e ambientais

O gênero *Pythium* pertence ao filo Oomycota, cujos membros caracterizam-se por: 1) produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada para colonizar novos ambientes (MENDOZA; VILELA, 2013); 2) reprodução sexuada oogâmica; 3) parede celular composta de  $\beta$  (1,3) e  $\beta$  (1,6) glicanas, celulose e hidroxipolina (MOORE-LANDECKER, 1996); 4) talo diplóide; 5) mitocôndria com crista tubular; 6) características moleculares e bioquímicas peculiares, como uma rota alternativa para síntese do aminoácido lisina (ALEXOPOULOS et al., 1996; MOORE-LANDECKER, 1996). Nenhum dos oomicetos compartilha da mesma bioquímica dos esteroides (principal ergosterol) como os fungos. Espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium*, e *Phytophthora* possuem esteroides auxotróficos, ou seja, eles incorporam os esteróides do ambiente em lugar de os produzirem como ocorre com os fungos. Os esteróides são importantes para produção de estruturas sexuadas *in vitro*, mas não são necessários para o crescimento vegetativo da hifa (GROOTERS, 2003).

As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema. Primeiramente ocorre a colonização de plantas aquáticas, onde o oomiceto obtém substrato para o seu desenvolvimento e reprodução formando os zoosporângios (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; GAASTRA et al., 2010). Para haver a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e o acúmulo de água em banhados e lagoas (MILLER & CAMPBELL, 1982a, MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; MENDOZA; VILELA, 2013; SANTOS et al., 2014). Em 2008, Supabandhu et al., isolaram *P. insidiosum* a partir de amostras ambientais de água, demonstrando o habitat preferencialmente aquático, contudo

Vanittanakon et al. (2013), comprovaram por técnicas moleculares a presença de *P. insidiosum* também no solo.

Para o isolamento em meio de cultivo, *P. insidiosum* requer poucos nutrientes, sendo capaz de se desenvolver em uma faixa de temperatura que varia de 25 a 45 °C (GAASTRA et al., 2010). Após o seu crescimento as colônias apresentam-se hialinas ou esbranquiçadas, submersas, com curto micélio aéreo e padrão delicadamente radiado. As hifas são parcialmente septadas, possuem entre 4 e 10µm de diâmetro e apresentam ramificações perpendiculares laterais em ângulo reto (DE COCK et al., 1987). Para a invasão dos tecidos ocorre a secreção de proteases e enzimas hidrolíticas e inibidores das mesmas e proteínas efetoras que entram no citoplasma das plantas (JIANG; TYLER, 2012). A secreção de proteases e enzimas hidrolíticas a partir do ápice das hifas de *P. insidiosum* tem sido implicada como possíveis fatores de virulência (SHIPTON, 1987; RAVISHANKAR et al., 2001; ZANETTE et al., 2013a).

## **2.2 Pitiose**

### **2.2.1 Epidemiologia**

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, tendo sido relatada nas Américas, alguns países europeus, sudeste asiático, Oceania e recentemente na África (CHAFFIN et al., 1995; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; RIVIERRE et al., 2005; MOSBAH et al., 2012). Ainda que a doença acometa diferentes espécies de mamíferos incluindo humanos, é notada diferenças na prevalência da doença nas diferentes regiões. A maior parte dos casos em humanos está localizada no sudeste asiático, particularmente na Tailândia (THIANPRASIT; CHAIPRASERT; IMWIDTHAYA, 1996; KRAJEJUM et al., 2006).

Os casos em equinos têm sido reportados na Oceania (MILLER, CAMPEBELL, 1982), África (MOSBAH et al., 2012) e América Central (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Na América do Norte predominam os casos em cães (FISCHER et al., 1994; GROOTERS, 2003; OLDENHOFF et al.,

2014) e em equinos (MENDOZA; NEWTON 2005; WHITE et al., 2008). Na América do Sul as quatro espécies mais comumente afetadas em ordem crescente de importância são: bovinos (SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; GRECCO, 2009), ovinos (SANTURIO et al., 2008; PESSOA et al., 2012; CARRERA, 2013), caninos (NETO et al., 2010; ; PEREIRA et al., 2010; FERNANDES et al., 2012; PEREIRA et al., 2013) e equinos (SANTURIO et al., 2006a; ÁLVAREZ; GARCÍA; GARAY, 2010; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Não há predisposição por sexo, idade ou raça e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e homens (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996).

A maior parte dos relatos são de equinos e cães imunocompetentes (GAASTRA, et al., 2010), acredita-se que *P. insidiosum* possui quimiotaxia por pêlos, feridas, soluções de continuidade e mucosa intestinal (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). Porém em um estudo observou-se a adesão de zoósporos às bordas de cortes de pele, mas dificilmente em tecido íntegro (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; GROOTERS, 2003). Picadas de insetos são outra hipótese para porta de entrada, após Schurko et al. (2003) identificarem um isolado obtido de uma larva de *Culex* sp., alertando para um importante papel epidemiológico de insetos na transmissão da doença, diretamente em mosquitos infectados ou indiretamente como porta de entrada. As lesões localizam-se nas partes anatômicas em contato com água contendo zoósporos de *P. insidiosum* (GAASTRA et al., 2010; SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

Em 1998 Santurio et al., revelarem a presença de hifas no interior de folículos pilosos de bovinos com pitiose, dados estes corroboram aos estudos realizados por Ravishankar et al.(2001) e MacDonald et al. (2002) que demonstraram que a hifa não produz uma força suficiente para invadir a pele intacta, em compensação os autores demonstraram uma redução significativa da resistência tecidual através da secreção de proteases, que foram identificadas como serina proteases (DAVIS et al., 2006). Frequentemente o aparecimento das lesões está ligado a período chuvoso com a formação de campos alagados, e às estações mais quentes, favorável ao desenvolvimento de *P. insidiosum* em banhados e lagoas (MILLER; CAMPBELL, 1982).

Há diversas denominações para a pitiose, entre diferentes regiões do Brasil e em outros países. No Brasil a nomenclatura dada a pitiose está ligada a espécie afetada, em

equinos no estado do Rio de Janeiro é conhecida como “formigueiro” (CARVALHO; LEMOS; REIS JR et al., 2000), na Paraíba como “focinho de touro” nos casos de infecção rinofacial em ovinos (RIET-CORREA et al., 2008) e no Pantanal é conhecida como “ferida da moda” ou “ferida brava”, em menção ao aumento do número de casos após o ápice das cheias (LEAL et al., 2001; SANTOS, 2012).

Nos EUA e Austrália é denominada de “ficomicose equina”, “câncer dos pântanos”, “ferida de verão” e “sanguessuga da Flórida”. Na Índia é conhecida por “bursatee” em menção aos casos no início da estação chuvosa. No Japão é conhecida como “dermatite granular” e na América Latina é chamada de “espundia” (GAASTRA et al., 2010; ÁLVAREZ; VILORIA; AYOLA, 2013).

O primeiro caso de Pitiose diagnosticado no Brasil foi realizado por Santos e Londero (1974), pela avaliação histológica de lesões tumorais no tecido subcutâneo de equinos no estado do Rio Grande do Sul. A partir daí a enfermidade foi descrita em bovinos (SANTURIO et al., 1998; GABRIEL et al., GRECCO, 2009); ovinos (SANTURIO et al., 2008; PORTELA et al., 2010; CARRERA et al, 2013; UBIALI et al., 2013); caninos (NETO et al., 2010; FERNANDES et al., 2012; PEREIRA et al., 2013), muares (SANTOS, 2012) e em um homem adulto ferido com objeto de pesca (BOSCO et al., 2005). O Pantanal brasileiro concentra o maior número de casos de pitiose equina do mundo (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; LEAL et al., 2001), com prevalência média de 5% (SANTOS et al., 2013). No Brasil, a pitiose equina acarreta prejuízos significativos na produção desses animais (SANTURIO et al., 2006; FREY JR et al., 2007; DÓRIA et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012).

### 2.2.2 Patogenia

Uma vez em contato com o hospedeiro, os zoósporos perdem os flagelos, encistam e passam a secretar uma substância adesiva que o mantém aderido à pele. Pelo estímulo da temperatura corporal ocorre desenvolvimento de tubo germinativo que penetra nos tecidos dando origem a infecção, que se não tratada adequadamente leva o hospedeiro a morte (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; MENDOZA; VILELA, 2013).

A doença apresenta-se nas formas cutânea, subcutânea, ocular, gastrointestinal ou sistêmica e está intimamente ligada ao hospedeiro. As formas ocular e sistêmica são mais comuns em humanos (THIANPRASIT; CHAIPRASERT, IMWIDTHAYA, 1996; PRASERTWITAYKIJ et al., 2003; KRAJAEJUN et al., 2006); enquanto que as formas cutânea ou subcutânea e gastrointestinal são mais comuns em animais (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO; LEAL; MONTEIRO 2003; MENDOZA, 2005; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010).

Se a resposta imune for deficiente em eliminar o hospedeiro, uma vez nos tecidos as hifas liberam exoantígenos, que provocam uma estimulação da subpopulação de linfócitos Th2, com ativação de eosinófilos, mastócitos, IgE, interleucina (IL)-4, IL-10 e IL-5 (THITITHANYANONT et al., 1998; MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005; GAASTRA et al., 2010). No entanto a presença desse tipo de imunidade, não é capaz de eliminar o agente dos tecidos. Além disso, ocorre uma grande quantidade de eosinófilos degranulados no tecido conhecido como a reação de Splendore-Hoeppli, e mastócitos em torno das hifas causando lesões nos tecidos.

Estudos a nível de sistema purinérgico, corroboram com a hipótese de uma resposta imune do tipo Th2 em animais com pitiose, o aumento na atividade da enzima nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) em relação à hidrólise de trifosfato adenosina (ATP), sem alterações na hidrólise de difosfato de adenosina (ADP), culmina com uma diminuição do ATP extracelular, resultando em uma estimulação da resposta imune do tipo Th2, aumento da produção de IL-4 e ativação de eosinófilos e mastócitos (BACH et al, 2010). Ocorre também a redução da atividade da ecto-adenosina deaminase (E-ADA), responsável por uma forte ação anti-inflamatória e imunossupressora através da inibição da proliferação de linfócitos T e da secreção de citocinas (ANTONIOLI et al., 2013), enquanto que seu substrato adenosina fica elevado no soro de animais com pitiose (BACH et al, 2013; ZANATTE, 2014). Em altas concentrações, a adenosina inibe a resposta imunológica celular, diminuindo os níveis de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), reforçando o desenvolvimento de uma resposta imune Th2 na pitiose (MENDOZA; NEWTON, 2005).



### 2.2.3 Pitiose em animais

A pitiose é uma doença que acomete principalmente mamíferos, mas com um único relato de infecção natural em uma caracina, ave migratória da família dos tresquiornitídeos (PESAVENTO et al., 2008). A espécie equina é a mais atingida, principalmente nas formas cutânea e subcutânea (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996;). A enfermidade nestes animais caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos, com presença de massas necróticas chamadas de “kunkers” (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES et al., 1993).

Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas, granulomatosas, formando grandes massas teciduais (5 a 500 mm), com bordas irregulares, de aparência tumoral e com hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas semelhantes a corais, chamadas internacionalmente de “kunkers”(MILLER; CAMPBELL, 1984). Os “kunkers” variam de 2 a 10 mm de diâmetro, têm forma irregular, com aspecto arenoso e penetram no tecido granular dentro de pequenos seios formados ao longo do seu trajeto. O tamanho das lesões depende do local e duração da infecção e, apresentam secreção sero-sanguinolenta, muco-sanguinolenta, hemorrágica e, às vezes, mucopurulenta que flui através da ferida. Os animais apresentam intenso prurido e normalmente mutilam a lesão na tentativa de aliviar o desconforto. O envolvimento intestinal é a segunda forma mais frequente da infecção por *P. insidiosum* em equinos, seguido de raros relatos de casos de metástases via sistema linfático para pulmões e linfonodos regionais (CHAFFIN et al., 1995).

As lesões cutâneas são as mais frequentes e atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal, provavelmente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos (KWONCHUNG, 1994; MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; SANTURIO et al., 2006a; SANTOS et al., 2014). Entretanto as lesões também podem ser observadas na região da cabeça (PIREZAN et al., 2009; SANTOS et al., 2011b), podendo ocorrer disseminação para linfonodos regionais, ossos adjacentes e pulmões (REIS JR et al., 2003; GAASTRA et al., 2010). Dentre as dermatopatias equinas no estado do Rio Grande do Sul está em quarto lugar (BIANCHI, 2013), com índices de mortalidade e letalidade elevados. O período de incubação em equinos não é bem conhecido, mas estudos epidemiológicos (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012;

SANTOS et al., 2014) e estudos experimentais em coelhos (PEREIRA et al., 2008) indicam que o aparecimento das lesões pode variar de alguns dias a quase um mês.

A segunda espécie mais atingida é a canina e as infecções manifestam-se pela formação de piogranulomas gastrointestinais e cutâneos (MILLER et al., 1983a; FOIL et al., 1984; HOWERTH et al., 1989; FISCHER et al., 1994; GROOTERS, 2003; RODRIGUES et al., 2006; TROST et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; NETO et al., 2010; FERNANDES et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). As lesões gastrointestinais caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino que são compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, intenso infiltrado eosinofílico e presença de hifas (MILLER, 1983b; MILLER; OLCOTT; ARCHER, 1985; BENTINCK-SMITH et al., 1989; FISCHER et al., 1994; LILJEBJELKE et al., 2002; TROST et al., 2009). As lesões cutâneas apresentam-se como dermatite piogranulomatosa ulcerativa, contendo áreas de necrose infiltrada por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos (FOIL et al., 1984; DYKSTRA et al., 1999; HENSEL et al., 2003; MARTINS et al., 2012).

Também tem sido descrita como causa incomum de lesões cutâneas e subcutâneas em gatos (BISSONNETE et al., 1991; GROOTERS, 2003; RAKICH et al., 2005), bovinos (MILLER et al., 1985; SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005, GRECCO et al., 2009, PEREIRA et al., 2010), asininos (TABOSA et al., 1999; ÁLVAREZ et al., 2013; SANTOS et al., 2014), caprinos (CARMO et al., 2014) e ovinos (TABOSA et al., 2004; SANTURIO et al., 2008; PESSOA et al., 2012; CARRERA et al., 2013). Nas espécies não domésticas, *P. insidiosum* foi reconhecido como causa de doença pulmonar primária em uma onça-pintada (*Panthera onca*) da América Central (CAMUS et al., 2004), em um tigre de bengala (*Panthera tigris tigris*) (GAASTRA et al., 2010) em lesões cutâneas e gastrintestinais em um urso de zoológico (GROOTERS, 2003) e, também, como causa de lesão mandibular subcutânea (WELLEHAN et al., 2004) e vulvar em camelos (VILELA et al., 2012).

#### 2.2.4 Pitiose em humanos

A pitiose em humanos é considerada uma doença grave de caráter crônico, de difícil tratamento, levando principalmente à enucleação, amputação e até mesmo à morte. A maior parte dos casos de pitiose em humanos foi relatada na Tailândia, onde a

doença é considerada endêmica (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989; IMWIDTHAYA, 1994b; IMWIDTHAYA, 1995; KRAJAEJUN et al., 2006; KRAJAEJUN, 2014a; HAHTAPORNSAWAN et al., 2014; PERMPALUNG et al., 2015). No entanto, casos esporádicos têm sido relatados em outros locais, como nos EUA (SHENEP et al., 1998; HOFFMAN et al., 2011; SCHLOEMER et al., 2013), Austrália, Nova Zelândia, Haiti, Malásia e Jamaica (GAASTRA et al., 2010; ; PAN et al., 2014). No Brasil, foi descrito um único caso de pitiose subcutânea em um homem no estado de São Paulo após ferimento com anzol (BOSCO et al., 2005).

As infecções por *P. insidiosum* em humanos podem apresentar-se de três formas, podendo ou não estar associada à talassemia: 1) lesões granulomatosas no tecido subcutâneo; 2) forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos; 3) ceratite (IMWIDTHAYA, 1994a; IMWIDTHAYA, 1995; LAOHAPENSANG et al., 2009). Franco et al. (2010) relataram Pitiose sistêmica em uma criança com queimaduras.

Atividades relacionadas à agricultura em áreas irrigadas, ou atividades de recreação em água parada são os fatores predisponentes à infecção. Além disso, a maioria dos casos em humanos na Tailândia foi reportada em pacientes talassêmicos (KRAJAEJUN et al., 2006). A maneira como a talassemia predispõe a doença ainda é incerta, mas estudos apontam que a sobrecarga de ferro nesses pacientes pode favorecer o agente diretamente através do aporte de ferro, ou indiretamente, através das complicações imunológicas decorrentes do excesso de ferro no organismo (SCHAIBLE & KAUFMANN, 2004; LAOHAPENSANG et al., 2009; SCHLOEMER et al., 2013; ZANETTE et al., 2013a).

### 2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico precoce é essencial para o sucesso no tratamento das infecções por *P. insidiosum*. Métodos tradicionais como o aspecto das lesões, história clínica, histopatologia e o isolamento do agente em meio de cultura, que tinham resultados imprecisos ou até mesmo demorados, deram espaço a métodos mais precisos e rápidos, como imunohistoquímica, sorologia por testes imunoenzimáticos (ELISA), reação em

cadeia da polimerase (PCR), imunodifusão em gel de ágar, imunocromatografia, entre outros (SANTURIO et al., 2006b; GAASTRA et al., 2010; ALVES et al., 2001; GROOTERS; GEE; 2002; BOTTON et al., 2011; MARTINS et al., 2012; CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013; TONDOLO et al., 2013; HARTFIELD; GROOTERS; WAITE et al., 2014).

O isolamento e identificação do agente são essenciais para o diagnóstico definitivo e diferencial de pitiose em equinos, uma vez que deve ser diferenciada de habronemose cutânea, conidiobolomicose, zigomicose, neoplasia, tecido de granulação exuberante e granulomas causados por bactérias ou por outros fungos ou oomicetos (CHAFFIN et al., 1992; GROOTERS; GEE, 2002; SANTOS et al., 2010; UBIALI et al., 2013). Em caninos o diagnóstico diferencial da pitiose deve incluir infecções causadas por zigomicetos e oomiceto do gênero *Lagenidium* (GROOTERS, 2003; MENDOZA; VILELA, 2009). Em ovinos, principalmente em lesões nasais deve ser diferenciado de conidiobolomicose (BOABAID et al., 2008; RIET-CORREA et al., 2008; UBIALI et al., 2013). Já em humanos a pitiose deve diferenciada de lagenidiomicose (REINPRAYOON et al., 2013), peniciliose, aspergilose e mucormicose (MENDOZA; PRASLA; AJELLO, 2004; BOSCO et al., 2005).

Estudos moleculares para identificação de *P. insidiosum* também tem sido utilizados e melhorados em laboratórios para diferenciação de outros patógenos semelhantes a este oomiceto através da amplificação e regiões específicas do DNA de *P. insidiosum* como a região do espaçador intergênico (IGS-1) compreendido entre os genes LSU e 5S RNAr (SCHURKO et al., 2004); a detecção em tecidos de animais com pitiose por meio da amplificação da região ITS1, 5.8s e ITS2, através da técnica de PCR seguido de uma segunda PCR (nested) com primers específicos para este oomiceto (BOSCO et al., 2008; BOTTON et al., 2011; SALIPANTE et al., 2012; THONGSRI et al., 2013; KOSRIRUKVONGS, 2014).

#### 2.2.6 Tratamento da pitiose

Para o tratamento da pitiose três métodos terapêuticos são frequentemente utilizados: cirurgia, quimioterapia e imunoterapia (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). A remoção cirúrgica radical, incluindo a amputação do membro afetado, é o

método mais utilizado e efetivo em humanos e animais com pitiose (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989; IMWIDTHAYA, 1994a; IMWIDTHAYA, 1995; KRAJAEJUN et al., 2006; LAOHAPENSANG et al., 2009; GAASTRA et al., 2010; SANGRUCHI et al., 2013; KRAJAEJUN, 2014; HAHTAPORNSAWAN et al., 2014; PAN et al., 2014; PERMPALUNG et al., 2015). O debridamento de lesões de pele em equinos e caninos é bastante comum (GAASTRA et al., 2010; SANTOS et al., 2011c). Para evitar recidivas, a remoção cirúrgica requer a retirada de toda a região afetada, o que muitas vezes não é possível quando a lesão acomete órgãos vitais, ou situa-se em regiões anatômicas delicadas como região ventral do abdômen, membros e ossos (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995).

Taxas de recorrência têm sido observadas, o que ilustra a dificuldade do controle desta doença (MENDONZA; VILELA, 2009). Em animais, a remoção cirúrgica apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais (MILLER, 1981). Associações do tratamento cirúrgico com antifúngicos ou iodeto de potássio são descritas em casos de cura terapêutica. Terapias satisfatórias para cães foram observadas (PEREIRA et al., 2013) e o tratamento de equinos com antifúngicos mostra-se economicamente inviável (SANTURIO; LEAL; MONTEIRO, 2003).

Considerando que os principais fármacos antifúngicos agem direta ou indiretamente sobre o ergosterol e que *P. insidiosum* não tem este componente em sua membrana citoplasmática, é compreensível que casos de pitiose não respondam satisfatoriamente ao tratamento com antifúngicos (SANTURIO et al., 2006a; GROOTERS, 2003; GAASTRA et al., 2010). No entanto resultados contraditórios com o uso de antifúngicos no tratamento da pitiose têm sido relatados. A cura clínica da pitiose foi alcançada nesses, relatos com itraconazol com terbinafina ou anfotericina B. Acredita-se que o uso de antifúngicos desenvolvam poros sobre a membrana plasmática possibilitando a entrada dos demais antifúngicos ocorrendo instabilidade da membrana, desequilíbrio osmótico, lise e morte celular (BISSONNETTE et al., 1991; TRISCOTT; WEEDOM; CABANA 1993; SHENEP et al., 1998; MENDOZA; PRASLA; AJELLO; 2004; KRAJAEJUN et al., 2006; SANTOS, 2012; PEREIRA et al., 2013).

Esses achados motivaram a realização de diversos estudos *in vitro* e *in vivo* com fármacos de diferentes classes terapêuticas. Estudos *in vitro*, com isolados de *P. insidiosum* apresentam susceptibilidade variável à caspofungina (PEREIRA et al., 2007), voriconazol, itraconazol e terbinafina (ARGENTA et al., 2008). Avaliações da associação de fármacos antifúngicos, *in vitro*, mostra promissores resultados, com

sinergismo encontrado na associação de anfotericina B + terbinafina (Cavalheiro et al., 2009b), terbinafina + antifúngicos azólicos e terbinafina + caspofungina (Cavalheiro et al., 2009a), micafungina + deferazirox (Zanette et al., 2014). Resultados instigantes também foram encontrados em estudos *in vitro* com os antibacterianos azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina (LORETO et al., 2011; MAHL et al., 2012; LORETO et al., 2014).

Uma alternativa para o tratamento de equinos afetados pela pitiose foi proposto por Miller (1981), que desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do agente. Nas décadas de 80 e 90 vários autores utilizaram a imunoterapia, fazendo modificações na técnica original (MENDOZA; ALFARO, 1986). No Brasil, o teste de eficiência do imunoterápico PITIUM-VAC<sup>®</sup> para o tratamento da pitiose equina variou de 50% a 83,3%, sendo produzido a partir de culturas de *P. insidiosum* (MONTEIRO, 1999). A cura induzida pela imunoterapia não está totalmente esclarecida. Acredita-se que antígenos citoplasmáticos expostos ao sistema imune com vacinação originam uma resposta humoral e celular, e que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia baseiam-se principalmente na resposta celular, devido às alterações teciduais ocorridas (MENDONZA et al., 2003).

Pires (2012) propôs o tratamento com fototerapia utilizando três diferentes fotossensibilizadores. Acredita-se que sob iluminação de comprimento de onda específico, o fotossensibilizador é excitado e reage com oxigênio celular, dando origem a espécies reativas de oxigênio capazes de promover danos a biomoléculas da célula alvo. O tratamento foi realizado utilizando-se coelhos com pitiose experimental e quatro equinos naturalmente infectados. Os resultados demonstraram aproximadamente 95% de cura em coelhos e em equinos, regiões de cicatrização tecidual com apenas duas sessões de fototerapia.

Estudos demonstrando a afinidade de *P. insidiosum* por ferro (KRAJAEJUN et al., 2011; ZANETTE et al., 2013b), e a presença dessa enfermidade em pacientes com distúrbios hemolíticos e consequente sobrecarga sistêmica de ferro, abriram espaço para estudos utilizando-se fármacos quelantes de ferro. O uso de deferazirox, um quelante oral utilizado por pacientes que recebem transfusões sanguíneas frequentes, mostrou-se como uma boa alternativa para o tratamento de mucormicose em modelos experimentais murinos (IBRAHIM et al., 2011). A utilização diária de deferazirox em coelhos com pitiose experimental diminuiu o tamanho das lesões, embora em proporções menores do que o grupo tratado com imunoterápico (ZANETTE et al., 2013c). Além disso, houve

disseminação da doença na metade dos coelhos tratados com o quelante, colocando em confronto a eficácia do tratamento.

### 2.2.7 Modelos experimentais

Até o momento, não foi possível reproduzir a pitiose através de infecção experimental nas espécies animais infectadas naturalmente. No entanto, a susceptibilidade de coelhos como modelo experimental para a pitiose foi demonstrada pela inoculação subcutânea de zoósporos, ocorrendo o desenvolvimento de nódulos que evoluem para fibrogranulomas eosinofílicos (MILLER & CAMPBELL, 1983). Portanto, o modelo de pitiose experimental em coelhos tem sido utilizado para estudar os diferentes aspectos relacionados à doença: fisiopatologia (ZANETTE et al., 2013a), imunologia (BACH et al., 2010; BACH et al., 2013), diagnóstico (SANTURIO et al., 2006b; BOTTON et al., 2011) e tratamento (SANTURIO et al., 2003; ARGENTA et al., 2012; LORETO et al., 2012; PIRES et al., 2013; ZANETTE et al. 2013b).

As razões pelas quais os animais comumente reportados com pitiose não desenvolvem a doença de forma experimental não são conhecidas (GAASTRA et al., 2010). Recentemente, Zanette et al. (2013d) conseguiram reproduzir a doença em moscas *Drosophila melanogaster*. Apesar do índice de mortalidade das moscas ter sido baixo (ao redor de 26%), o estudo mostrou a importância dos receptores toll, os quais estão relacionados à imunidade celular contra fungos, na patogenia da doença.

## 2.3 Fármacos

### 2.3.1 Fármacos antifúngicos

Comparado com a grande variedade de fármacos e associações antibacterianas, atualmente poucas classes de fármacos antifúngicos estão disponíveis. O desenvolvimento de antibacterianos apresenta vantagens sobre os antifúngicos uma vez

que existem múltiplos sítios de ação e ligação das bactérias que não estão presentes nas células dos mamíferos. Por outro lado os fungos compartilham similaridades com as células de mamíferos, o que dificulta a pesquisa de novos fármacos e sítios de ação. Atualmente os principais alvos dos antifúngicos são sobre os esteróides da membrana plasmática, na síntese de ácidos nucleicos e sobre os constituintes da parede celular (quitina,  $\beta$ -(1,3)-glicana e manonoproteínas).

Os fármacos sobre ação dos esteróides (ergosterol) da membrana plasmática incluem os derivados poliênicos (anfotericina B, nistatina), azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol) e alilaminas (terbinafina). Os antifúngicos poliênicos ligam-se diretamente ao ergosterol, formando canais (poros), que aumentam a permeabilidade da membrana, com perda do material citoplasmático, o que pode resultar em morte celular, enquanto que derivados azólicos e as alilaminas interferem na síntese de ergosterol através da inibição da C-14- $\alpha$ -demetilase e esqualeno epoxidase, bloqueando etapas precursoras na síntese de ergosterol, respectivamente (DREW, 2010).

As equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos que agem inibindo a síntese da enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glicana, um dos principais componentes da parede celular fúngica. A diminuição de  $\beta$ -(1,3)-D-glicana pode levar a perda da integridade celular e lise da célula fúngica (JOHNSON e MOHR, 2010).

### 2.3.2 Fármacos antibacterianos

Devido à incapacidade do gênero *Pythium*, em sintetizar o ergosterol, expõe a dificuldade terapêutica e restringe o arsenal de drogas que podem ser utilizadas para o tratamento da enfermidade (SANTURIO et al., 2003b). Nestas situações, há a necessidade de uma alternativa terapêutica, principalmente para a pitiose em humanos. Uma das alternativas pode ser o uso de antibacterianos como as tetraciclinas e macrolídeos que possuem atividade antimicrobiana, isolados e em associação com outras drogas, contra organismos eucariotos, incluindo algas (LASS-FLORL & MAYR, 2007), fungos (LEW; BECKETT; LEVI, 1977; NGUYEN et al., 1997; SHI et al., 2010; LORETO et al, 2011; MAHL et al., 2012; LORETO et al, 2014), e protozoários (GOZALBES et al., 2000; LIN et al., 2002; SAHU; WALKER; TEKWANI, 2014).



Dentre os mecanismos de ação destas drogas, pode-se citar a inibição da síntese protéica (NGUYEN et al., 1997; RAWN; VAN ETTEN, 1978b), inibição seletiva da atividade mitocondrial (LIN et al., 2002), e influxo de cálcio intracelular (SHI, et al., 2010).

As tetraciclinas agem inibindo a síntese protéica dos microrganismos sensíveis, ligando-se aos ribossomos. Estes fármacos impede que o RNA-transportador (RNAt) se fixe no ribossomo e, deste modo, a síntese protéica é inibida (CHAMBERS e DECK, 2009). O mecanismo de ação dos macrolídeos ocorre através da inibição da síntese protéica dependente de RNA, através da ligação em receptores localizados na porção 50S do ribossomo, particularmente na molécula 23S do RNA, impedindo as reações de transpeptidação e translocação. O mecanismo de ação de antibacterianos contra *P. insidiosum* deve ser semelhante à descrita para a *Pythium ultimum*, isto é, reduzida incorporação de aminoácidos em proteínas, a inibição da síntese protéica e inibição do transporte de aminoácidos (RAWN; VAN ETTEN, 1977).

### 2.3.3 Uso de antibacterianos frente a organismos fúngicos

Diversos estudos relatam atividade *in vitro* de drogas antibióticas frente a agentes fúngicos. antibacterianos quinolonas atuam na inibição da DNA girase bacteriana, e se acredita que esta inibição é inespecífica, pois estudos têm demonstrado ação em agentes não bacterianos. Shen et al. (1992) relata que quinolonas podem ter efeito inibitório na enzima topoisomerase II fúngica. A DNA girase é um tipo de topoisomerase II, presente em células eucarióticas e procarióticas (DYKSTRA et al., 1994; FOSTEL; MONTGOMERY; LARTEY, 1996; GELLERT et al., 1977; SHEN & FOSTEL, 1994; SUGINO et al, 1977). Há demonstrações de algumas quinolonas potencializando efeitos de agentes antifúngicos (PETROU; ROGERS, 1988; VANGDAL; BERGAN, 1984; WALSH et al., 1983). A fluoroquinolona DU-6859a, não possui atividade antifúngica isolada (SATO et al., 1992), mas atua sinergicamente com anfotericina B e fluconazol. Isto ocorre possivelmente pela entrada de DU-6859a na célula, após danos à membrana por ação da anfotericina B, permitindo a ação intracelular da quinolona, ocorrendo inibição de topoisomerase II dos fungos (ELSEA; OSHEROFF; NITISS, 1982).

Anfotericina B demonstra maior eficácia *in vitro*, frente a coccidioidomicose, quando associada a tetraciclina (HUPPERT; SUN; VUKOVICH, 1974). Os análogos de tetraciclina, flucitosina e rifampina também parecem aumentar a atividade *in vitro* de anfotericina B frente a *Aspergillus* (HUGHES et al., 1984). A anfotericina B se liga aos esteróis presentes na membrana celular, aumentando sua permeabilidade, com consequente entrada e ação da flucitosina e rifampina na síntese de RNA (de proteínas) (MEDOFF et al., 1972).

Anfotericina B e rifampina são sinérgicos *in vitro* também frente a espécies de *Candida* (BEGGS; SAROSI; WALKER, 1980; EDWARDS et al., 1980), *Histoplasma capsulatum* (KOBAYASHI et al., 1972), *Coccidioides immitis* (RIFKIND; CROWDER; HYLAND, 1974), *Saccharomyces cerevisiae* (MEDOFF et al., 1972), *Cryptococcus neoformans* (HUGHES et al., 1984), *Aspergillus* e *Fusarium* (CLANCY et al., 1997).

Em estudo similar, Lew; Beckett ; Levin (1977) verificaram o mesmo sinergismo entre anfotericina B e minociclina, frente a *Candida albicans*. Foi estudada atividade fungicida sinérgica, *in vitro*, entre anfotericina B e o inibidor de síntese protéica azitromicina, frente a *Aspergillus* e *Fusarium*. A azitromicina, que não tem atividade antifúngica intrínseca, aumenta a atividade da anfotericina B. O uso de anfotericina B, gera danos à membrana celular fúngica, permitindo a entrada de azitromicina, que exerce sua atividade antimicrobiana por inibição da síntese protéica (NGUYEN et al., 1997).

Polimixina B é um antibiótico peptídico que já demonstrou ação inibitória a *S. cerevisiae*, provocando danos às membranas citoplasmáticas e vacuolares (SCHWARTZ et al., 1972), o que sugere que sua atividade antimicrobiana se estende a eucariotos. Ben-Ami et al. (2010) verificaram que a polimixina E (colistina) possui atividade inibitória *in vitro* frente a *Mucorales*. Cavalheiro et al. (2009b) avaliaram, frente a *P. insidiosum*, a atividade *in vitro* de terbinafina em combinação com metronidazol, rifampicina, ibuprofeno ou fluvastatina, verificando sinergismo entre terbinafina e anfotericina B. Devido à ausência de ergosterol na membrana celular de *P. insidiosum*, outro mecanismo adicional deve estar envolvido na ação de anfotericina B.

### 2.3.4 Susceptibilidade da família Pythiaceae a antibacterianos

O gênero *Pythium* se difere dos fungos por ser muito sensível a antibacterianos ribossomos 70S ativos, como tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina e eritromicina (LEARY et al., 1982; MARCHAN; SMITH, 1968; RAWN; VAN ETEN, 1978; TSAO, 1970). Alguns desses antibacterianos podem ter mais de um modo de ação em fungos pythiaceos (RAWN; VAN ETEN, 1978a), sendo sensíveis a concentrações relativamente baixas de alguns destes antibacterianos, responsáveis por inibição da proteína sintetase *in vivo* em procariotos, mas não em eucariotos (HENDRIX, 1974; TSAO, 1970).

A síntese de citocromo requer produção coordenada de peptídeos em ribossomos citoplasmáticos e mitocondriais (SCHATZ; MASON, 1974). Marchan e Smith (1968) relataram diminuição de alguns citocromos em isolados de *Pythium ultimum*, tratados com cloranfenicol. Carnes e Leary (1977) reportaram que a incorporação de aminoácidos em proteínas de mitocôndrias isoladas de *Phytophthora palmivora* foi inibida por cloranfenicol, sugerindo que o cloranfenicol atue no ribossomo mitocondrial.

O sistema de proteínas mitocondriais de eucariotos possui características procarióticas, diferenciando-as da proteína citoplasmática. Este fato diferencia a incorporação de aminoácidos mitocondrial, que pode ser inibida por baixas concentrações de cloranfenicol (SCHATZ; MASON, 1974; PESTKA, 1975; LAMB; CLARK-WALKEG; LINNANE, 1968; GRIVELL, 1967; DE VRIES; AGSTERIBBE; KROON, 1971).

Com algumas exceções, relato de sensibilidade de oomicetos fitopatogênicos da família Pythiaceae a antibacterianos têm sido descritos apenas pela inibição do crescimento (TSAO, 1970). Foi desenvolvido um estudo de detecção dos efeitos, a curto prazo de antibacterianos nestes fungos, com tetraciclina e cloranfenicol, onde se evidenciou inibição da incorporação de aminoácidos em um isolado de *Pythium ultimum* (RAWN; VAN ETEN, 1977). Rawn e Van Eten (1978b) verificaram ação inibitória de tetraciclina, eritromicina, ciclohexamida e cloranfenicol incorporados a meio de cultura em caldo, frente à *Pythium ultimum*.

Ocorre disparidade do transporte de aminoácidos, com o uso de tetraciclina e cloranfenicol, em pelo menos uma região de ação dos antibacterianos. Mas o local de

efeito inibitório direto na proteína sintetase parecem ser os ribossomos citoplasmáticos ou mitocondriais. O sistema de síntese de proteína mitocondrial (SPM) eucariótica é geralmente sensível a baixas concentrações destas drogas *in vitro*, mas estes ribossomos produzem apenas uma pequena porcentagem da massa de proteína celular, sendo o grande volume produzido pelo sistema de síntese de proteína citoplasmático (SCHATZ; MASON, 1974). A tetraciclina também afetaria diretamente o sistema de síntese protéica citoplasmático, sendo consistente com relatos de inibição *in vitro* do sistema citoplasmático pela tetraciclina (PESTKA, 1971); entretanto eucariotos não são sensíveis à tetraciclina *in vivo*.

Os resultados com eritromicina, obtidos por Rawn e Van etten (1978), são consistentes com o efeito da inibição de síntese proteica de membrana. A inibição do crescimento pode afetar o desenvolvimento de novas mitocôndrias. A quebra da construção mitocondrial, além de um período de duplicação, pode reduzir o crescimento, e tratamentos por 24h podem inibir o crescimento completamente.

A inibição da proteína sintetase pela tetraciclina indica que ela entra rapidamente na célula. Ocorrendo permeabilidade incomum de tetraciclina e cloranfenicol, e insensibilidade atípica de Pythiaceae a antibacterianos poliênicos membrana ativos (HENDRIX, 1974). É provável que onde a inibição de SPM seja mais induzida pelo fármaco, o seu acesso ao SPM leva à sensibilidade incomum. Os efeitos combinados da tetraciclina no transporte e síntese protéica são suficientes para produzir completa inibição do crescimento (RAWN; VAN ETTEN, 1987).

Oomicetos fitopatogênicos do gênero *Pythium*, não demonstram sensibilidade a antifúngicos poliênicos na ausência de esteróis, podendo tornar-se sensível em meios contendo esteróis (ELIOTT, 1977; LAMPEN, 1966; ORCI et al., 1990). Esta conexão reflete o papel dos esteróis na estrutura e função da membrana celular, podendo ter papel na permeabilidade. Tendo em vista as diversas vias que os esteróis são vistos afetando estes oomicetos, foi investigada a possibilidade de que os mesmos poderiam modificar a sensibilidade das espécies de *Pythium* para estes antibacterianos ribossomativos. Rawn e Schwarz (1987) demonstraram atividade inibitória, com diminuição do crescimento radial do micélio, de *Pythium* spp. frente a tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol, quando adicionados ao meio de cultura, verificando a diminuição da atividade inibitória com o acréscimo de colesterol aos meios de cultura.

Loreto et. al. (2011), estudaram a susceptibilidade *in vitro* de 26 isolados da espécie *P. insidiosum* pela técnica de microdiluição, demonstrando a concentração inibitória mínima (CIM) aos antibacterianos doxiciclina (CIM: 0,5-8 µg/mL), minociclina (CIM: 0,125-2 µg/mL), oxytetraciclina (CIM: 2-32 µg/mL), tetraciclina (CIM: 2-32 µg/mL), azitromicina (CIM: 2-32 µg/mL), claritromicina (CIM: 0,5-8 µg/mL) e eritromicina (CIM: 2-32 µg/mL). Um ano após, Mahl et al. (2012) observaram a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) de 24 isolados de *P. insidiosum* dos antibióticos paranomicina (CIM: 32-64 µg/mL e CFM: 32-128 µg/mL), gentamicina (CIM: 32-64 µg/mL e CFM: 32-128 µg/mL), neomicina (CIM: 32-64 µg/mL e CFM: 32-128 µg/mL), estreptomicina (CIM: 32-64 µg/mL e CFM: 32-128 µg/mL) e tigeiciclina (CIM: 0,25-2 µg/mL e CFM: 1-8 µg/mL).

Recentemente Loreto et al. (2014), avaliaram por diferentes técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo, propostas pelo CLSI e E-test, a susceptibilidade de 27 isolados de *P. insidiosum* e uma cepa padrão de *P. aphanidermatum*, frente antifúngicos e antibacterianos. Os CIMs 90 Anfotericina B (>32 µg/mL), antifúngicos azólicos (>32 µg/mL), terbinafina (2-16 µg/mL), equinocandinas (16 - >32 µg/mL) e uma variedade de antibacterianos entre eles azitromicina (1-8 µg/mL), cloranfenicol (4 - >256 µg/mL), claritromicina (0,25-8 µg/mL), clindamicina (4-256 µg/mL), doxicilina (1-8 µg/mL), eritromicina (1-32 µg/mL), florfenicol (8->256 µg/mL), ácido fusídico (> 256 µg/mL), linezolid (1-32 µg/mL), minociclina (0,125-4 µg/mL), mupirocin (2-32 µg/mL), roxitromicina (2-128 µg/mL) e tetraciclina (1-32 µg/mL).

### 2.3.5 Atividade de Timol e Carvacrol frente a fungos patogênicos

Alguns extratos de plantas e seus metabólitos secundários possuem efeitos inibitórios e letais dose-dependente sobre microrganismos tais como bactérias, fungos, vírus e protozoários (POZZATTI et al., 2008). Diversos óleos voláteis são conhecidos por possuírem propriedades antifúngicas e, desta forma, são potencialmente aplicáveis como agentes antimicóticos. Rao et al. (2010) ao estudarem o mecanismo de ação e atividade antifúngica de terpenóides fenólicos concluíram que sua atividade antimicrobiana estão relacionadas a modificações na estrutura da parede celular do microrganismo. Mais especificamente, alteram a permeabilidade da membrana

citoplasmática pela modificação no gradiente de íons de hidrogênio ( $H^+$ ), potássio ( $K^+$ ) e cálcio ( $Ca^{++}$ ). Esta alteração conduz na deterioração de processos essenciais para a sobrevivência da célula como tais como o transporte de elétrons, de proteínas, passos da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas (AHMAD et al., 2011; RAO et al., 2010; CAMELE et al., 2012; AHMAD; KHAN; MANZOOOR, 2013; HOMEYER et al., 2015). Desta forma ocorre perda do controle quimiosmótico e morte do organismo. Além disso, o rompimento da parede celular deve-se ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que se acumulam nas membranas (RAO et al., 2010).

Salgueiro et al. (2003) estudaram a composição e atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum virens* frente a espécies de *Candida*. O óleo caracterizou-se pelo alto conteúdo de carvacrol (68,1%), cujo efeito fungicida foi alcançado pela extensa lesão na membrana celular. Da mesma forma Pina Vaz et al (2004), ao analisarem a atividade antifúngica do óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*, *T. zygis* sub especie *T. zygis* e *T. mastichina* sub especie *mastichina*), suas frações majoritárias (carvacrol e timol), anfotericina B e fluconazol concluíram que e o principal mecanismo de ação observado foi a nível de membrana celular. Corrobora com os dados obtidos por Pinto et al. (2009), que avaliaram a composição, a atividade antifúngica e o mecanismo de ação do óleo essencial de *Thymus pulegioides* sobre *Candida*, *Aspergillus* e dermatófitos demonstrando CIMs mais baixas que o fluconazol e a anfotericina B. As análises químicas do óleo demonstraram alto conteúdo de carvacrol e timol. Neste mesmo estudo a análise de citometria de fluxo e análise do ergosterol da membrana fúngica, demonstrou que os principais danos ocorreram na membrana.

Muitos estudos *in vitro* foram realizados avaliando a ação antifúngica de timol e carvacrol frente à fungos patogênicos em animais e plantas entre eles encontram-se espécies do gênero *Candida* sp. (MANOHAR et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003; PINA-VAZ et al., 2004; CHAMI et al., 2004; POZZATTI et al., 2008; DALLEAU et al., 2008; PINTO et al., 2009; AHMAD et al., 2011; AHMAD; KHAN; MANZOOOR, 2013; GALLUCCI et al., 2014), *Aspergillus* sp (PINTO et al., 2009; SOKOVIĆ et al, 2009; GUARDA et al., 2011; BISHT et al., 2011; ABBASZADEH et al., 2014; HOMEYER et al., 2015), *Fusarium* sp. (ZABKA; PAVELA, 2013; ABBASZADEH et al., 2014; HOMEYER et al., 2015), *Penicillium* sp. (SOKOVIĆ et al, 2009; CAMELE et al., 2012; PÉREZ-ALFONSO et al., 2012; ZABKA; PAVELA, 2013), dermatófitos (PINTO et al., 2009; SOKOVIĆ et al, 2009; MUGNAINI et al., 2013), *Pythium* sp. (FONSECA et al., 2014; MAISSA; WALID et al., 2014), *Monilia* sp. (MAISSA;

WALID et al., 2014; HAZEM et al., 2015), *Phytophthora* sp. (CAMELE et al., 2012), *Rhizopus* sp. (CAMELE et al., 2012; MAISSA; WALID et al., 2014; ABBASZADEH et al., 2014), *Cladosporium* (SOKOVIĆ et al, 2009; ABBASZADEH et al., 2014), *Botrytis* (MAISSA; WALID et al., 2014; ABBASZADEH et al., 2014) entre outros.

Estudos *in vivo*, realizado por Chami et al. (2004), avaliaram a ação antifúngica de eugenol, carvacrol e nistatina sobre Candidose oral induzida em ratos imunossuprimidos. Os resultados demonstram que em 8 dias de tratamento a solução que continha carvacrol (94,46%) foi mais eficiente em conter o crescimento de *Candida*, quando comparado aos grupos, nistatina (91,54%), eugenol (76,93%) e animais imunossuprimidos não tratados (64,96%).

Mugnaini et al. (2013) testaram uma formulação antifúngica contendo *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* no tratamento de ovinos com dermatofitose causada por *Trichophyton mentagrophytes*. Para avaliação da regressão da infecção foram realizadas medidas da circunferência da lesão, o tratamento foi realizado diretamente sobre as áreas afetadas, demonstrando regressão das lesões em torno do 15º dia. Os óleos com maior atividade antifúngica *in vitro*, continham como composto majoritário carvacrol e timol.

### 2.3.6 Susceptibilidade do gênero *Pythium* frente a novos compostos

A dificuldade no tratamento de doenças causadas pelo gênero *Pythium* tanto em animais como em plantas, tem estimulado pesquisas em busca de novas moléculas com ação anti-*Pythium*. Krajaejun et al. (2012), estudaram a susceptibilidade de 30 isolados de *P. insidiosum* frente a uma mistura sintética de compostos orgânicos voláteis (B23 COV) produzida pelo fungo endofítico *Muscodor crispans*. A susceptibilidade do oomiceto foi avaliada por medida do crescimento radial da colônia na presença de B23 COV e comparado ao controle. Neste estudo o efeito fungicida foi alcançado na dose de 10 µl de B23 COV e fungicida na dose de 20 µl de B23 COV.

Nesse mesmo contexto, Sriphana et al (2013), avaliaram 9 compostos extraídos das raízes de *Clausena harmandiana*, conhecida em tailandês como " Song fa " que é um vegetal usado em pratos tradicionais no nordeste da Tailândia e tem mostrado algumas atividades terapêuticas, tais como tratamento de doenças inflamatórias, dor de estômago

e cefaleia. Quatro dos compostos extraídos clausine L (40 mg/disco), clausine K (10 mg/disco), N-methylswietenidine B (58 mg/disco) e zapoterin (40 mg/disco) exibiram atividade antifúngica pela técnica de disco-difusão em comparação com os agentes antifúngicos terbinafina (100 mg/disco) e itraconazol (100 mg/disco) que não foram capazes de inibir o crescimento de *P. insidiosum*.

No mesmo ano, Suthiwong et al. (2014), isolaram a partir dos frutos de *Micromelum falcatum* quatro novos compostos, microminutin B, microminutin C, micromarinate, e secomicromelin, bem como 17 compostos já conhecidos. Todos os compostos foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra *Pythium insidiosum* utilizando o ensaio de difusão em disco. Os resultados demonstraram que quatro compostos incluindo secomicromelin, 7-metoxi-8-(4'-metil-3'-furanil) cumarina, micromarin B, eisomicromelin inibem o crescimento micelial de *P. insidiosum*.

Maissa e Walid (2014) avaliaram a atividade antifúngica de óleos essenciais de *Thymus algeriensis* e *Thymus capitatus* de diferentes partes da Tunísia. A composição química foi analisada por meio de cromatografia gasosa / espectrometria de massa. As frações majoritárias de cada composto foram caracterizadas e variam conforme a região coletada, sendo o timol e o carvacrol os principais componentes. A atividade antifúngica foi avaliada por ensaios *in vitro* contra vários fungos oomicetos, e os compostos que continham maior teor de carvacrol foram mais nocivos às hifas, concluindo que carvacrol pode ter atividade antifúngica mais forte na inibição ou desenvolvimento do micélio em comparação com timol. Fonseca et al. (2014), também avaliaram a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Majorana Origanum*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* frente zoósporos de *Pythium insidiosum* pela técnica de microdiluição em caldo. Sendo que o óleo de *O. vulgare* (CIM: 0,05-1,75mg/mL) apresentou as melhores CIMs seguido de *O. majorana*, *M. piperita* e *R. officinalis* (CIM: 0,11-3,5 mg/mL). Estes resultados reforçam o potencial de utilização de óleos essenciais de plantas como agentes de controle em Infecções causadas por *P. insidiosum*.

### 2.3.7 Atividade antifúngica de combinação de fármacos

As associações antifúngicas têm sido pouco estudadas na micologia médica, e suas atividades contra *P. insidiosum* são quase desconhecidas; na pitiose humana e animal,



há relatos de sucesso pela combinação de terbinafina e itraconazol (SHENEP et al., 1998; PEREIRA et al., 2013; PERPAMLUNG et al., 2015) e Anfotericina B e iodeto de potássio (MENDOZA; PRASLA; AJELLO, 2004). A combinação de drogas de diferentes grupos pode ser uma estratégia de tratamento útil quando a monoterapia não encontra resultados satisfatórios.

Similar as diferenças encontradas no desenvolvimento de fármacos antibacterianos e antifúngicos, o desenvolvimento dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos está distante dos progressos já obtidos com os testes de susceptibilidade aos antibacterianos disponíveis. Os testes de susceptibilidade a antifúngicos foram padronizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI), como o primeiro protocolo aprovado em 1997 para *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*, enquanto que o protocolo descrito para os testes de susceptibilidade a antifúngicos para alguns fungos filamentosos foi aprovado em 2002. Atualmente o protocolo aprovado para fungos filamentosos, é o protocolo para testes de susceptibilidade para macro e microdiluição, M38-A2 (CLSI, 2008).

A interação de dois antibacterianos em sítios diferentes da célula antifúngica pode promover ações sinérgicas ou antagônicas. Os poros formados pela ação, da Anfotericina B sobre o ergosterol permite aumento da concentração intracelular de outros antifúngicos, na célula fúngica, resultando na interação sinérgica entre as drogas (BEGGS, 1976; BEGSS et al., 1986; CHAMBERS e DECK, 2009). No entanto, a redução da concentração de ergosterol resultante da terapia de antifúngicos azólicos faz com que existam menos sítios de ação de ergosterol para a anfotericina B, resultando em antagonismo, quando estes dois fármacos estão associados, situação está que nem sempre é observada na prática clínica (VAZQUEZ, 2008).

Os fármacos que alteram a farmacocinética dos compostos antifúngicos também podem gerar associações sinérgicas ou antagônicas. Por exemplo, sinergismo tem sido observado entre fluconazol e inibidores de protease, uma vez que estes diminuem o metabolismo hepático do fluconazol, resultando aumento da concentração (CHAMBERS e DECK, 2009). Por outro lado, a associação de fluconazol com fármacos que são metabolizados pelo sistema citocromo P450 resulta em uma associação antagônica, pois ocorre indução do metabolismo do fluconazol e diminuição da concentração plasmática deste azólico (LEWIS; KONTOYIANNIS, 2001).

Além das interações diretas com a célula fúngica, os compostos antifúngicos apresentam resposta imunomoduladoras, que associadas às necessidades do hospedeiro,

podem melhorar o prognóstico (BEN-AMI et al., 2008). A anfotericina desoxicolato apresenta propriedades pró-inflamatórias, com consequente liberação de citocinas de células mononucleares e neutrófilos *in vitro* (WILSON; THORSON; SPEERT, 1991; CLEARY et al., 1992), e induz a resposta de células *Th1 in vivo* (CENCI et al., 1997), enquanto que Anfotericina lipossomal produz um padrão mais anti-inflamatório de citocinas, consequentemente da indução do receptor Toll-like (BELLOCCHIO et al., 2004). A inibição de *Aspergillus fumigatus* apresenta-se reforçada quando macrófagos e monócitos são recrutados com o uso de equinocandinas (CHILLER et al., 2001), enquanto que a presença de fluconazol ou voriconazol está associada a melhora da fagocitose quando associado com terapias que estimulam o sistema imunológico (VORA et al., 1998; BALTCH et al., 2005).

A atividade anti-*P. insidiosum* de antibacterianos macrolídeos e tetraciclina, em especial as descritas por Mahl et al., (2012) e Loreto et al., (2011; 2014), aliado aos relatos de cura da Pitiose no uso de antifúngicos associados (BISSONNETTE et al., 1991; SHENEP et al., 1998; PEREIRA et al., 2013; PERPAMLUNG et al., 2015), alertam para possíveis interações sinérgicas na associação de antibacterianos e antifúngicos.

### 3.OBJETIVOS

#### 3.1 Gerais

- Avaliar a atividade *in vitro* das associações minociclina + azólicos (itraconazol ou voriconazol); minociclina + alilaminas (terbinafina); minociclina + poliênicos (anfotericina B); minociclinas + equinocandinas (acetato de caspofungina, micafungina ou anidulafungina), tetraciclinas (minociclina) + macrolídeos (azitromicina ou claritromicina) e tetraciclinas associadas (minociclina + tigeciclina), frente 30 isolados de *P. insidiosum*, utilizando-se o protocolo M 38-A2 determinado pelo CLSI (Clinical laboratory standards institute, 2008).

- Avaliar a atividade *in vitro* das associações de timol e carvacrol com itraconazol; terbinafina; anfotericina B, acetato de caspofungina, azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina, frente a 25 isolados de *P. insidiosum*, utilizando-se o protocolo M 38-A2 determinado pelo CLSI (Clinical laboratory standards institute, 2008).

- Avaliar e comparar alternativas de tratamento contra a pitiose *in vivo* com os antibacterianos azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina, em monoterapia e terapia combinada, utilizando coelhos como modelo experimental.

#### 3.2 Específicos

- Através do cálculo do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), classificar os efeitos das associações de antibacterianos, antifúngicos, carvacrol ou timol em sinérgico, aditivo/indiferente ou antagônico.

- Através da classificação das associações, selecionar as interações com o maior percentual de sinergismo da monoterapia e terapia combinada de antibacterianos para os testes *in vivo*.

- Avaliar as lesões de cada grupo de animais submetidos aos diferentes tipos de tratamento *in vivo* com antibacterianos, e verificar a ocorrência de diferenças histológicas, moleculares, níveis de anticorpos entre os grupos, determinando o grau de eficácia de cada tratamento.

- Através de diferentes tipos de métodos diagnósticos: isolamento do agente, PCR, Histopatologia das lesões e sorologia para avaliar a taxa de anticorpos (ELISA) de cada grupo de animais submetidos aos diferentes tratamentos *in vivo*, verificando a ocorrência de diferenças histológicas, laboratoriais e níveis de anticorpos entre os grupos determinando a capacidade de conter a infecção de cada tratamento com os antibacterianos azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina, em monoterapia e terapia combinada.

## **4. ARTIGOS**

Os resultados deste trabalho apresentam-se em formato de artigos. Os artigos e seus anexos estão formatados nas normas do periódico, ao qual foi submetido. A metodologia detalhada destes artigos está em anexos.

#### **4.1 Artigo 1**

**Sinergismo Observado *in vitro* com Azitromicina, Claritromicina, Minociclina ou Tigeciclina em Associação com antifúngicos contra *Pythium insidiosum***

**Artigo publicado no periódico Antimicrobial Agents and Chemotherapy**



## *In Vitro* Synergism Observed with Azithromycin, Clarithromycin, Minocycline, or Tigecycline in Association with Antifungal Agents against *Pythium insidiosum*

Francieli P. K. Jesus,<sup>a</sup> Laerte Ferreira,<sup>a</sup> Érico S. Loreto,<sup>b</sup> Maiara B. Pilotto,<sup>b</sup> Aline Ludwig,<sup>b</sup> Karine Bizzli,<sup>b</sup> Juliana S. M. Tondolo,<sup>b</sup> Régis A. Zanette,<sup>b</sup> Sydney H. Alves,<sup>c</sup> Janio M. Santurio<sup>b</sup>

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil<sup>a</sup>; Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>b</sup>; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>c</sup>

We describe here the *in vitro* activities of azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, terbinafine, voriconazole, anidulafungin, caspofungin, or micafungin against 30 isolates of the oomycete *Pythium insidiosum*. The assays were based on the CLSI M38-A2 technique and the checkerboard microdilution method. The main synergisms observed were through the combination of minocycline with amphotericin B (73.33%), itraconazole (70%), and micafungin (70%) and of clarithromycin with micafungin (73.33%).

Pythiosis is a life-threatening disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*, which can cause infections in humans and in animals, such as horses, bovines, cats, dogs, and sheep. Clinically, the disease may manifest in cutaneous, gastrointestinal, vascular, and systemic forms and has been described in tropical and subtropical areas (1). The hyphae of *P. insidiosum* are morphologically similar to those of certain mucoraceous molds, but *P. insidiosum* is not a true fungus because it does not synthesize ergosterol, which is the target of most antifungal drugs. Despite this challenge, two cases of pythiosis in humans, one case of ocular pythiosis and one case of pleuropneumonia (2, 3), have been successfully treated using combination antifungal therapy. However, combination antifungal therapy has been ineffective in cases of vascular and disseminated human pythiosis (4).

Previous studies have shown that the growth of *P. insidiosum* is inhibited *in vitro* by the glycolcyclic, macrolide, and tetracycline classes of antibacterial drugs (5, 6). However, studies evaluating the antimicrobial combination of antibacterial and antifungal agents against *P. insidiosum* have not been performed. In this context, this study evaluated the *in vitro* combination of the antibacterial drugs azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline with the antifungal drugs amphotericin B, itraconazole, voriconazole, terbinafine, anidulafungin, caspofungin, or micafungin against *P. insidiosum*.

Twenty-eight *P. insidiosum* isolates obtained from Brazilian cases of equine pythiosis and the reference strains ATCC 58.637 and CBS 101555 were evaluated in this study. The identities of the clinical isolates were confirmed using PCR-based assays (7). The antibacterial drugs azithromycin (Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Brazil), clarithromycin (Genix, Anápolis, Brazil), minocycline (Pharma Nostra), and tigecycline (Pfizer, New York, NY) and the antifungal drugs amphotericin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), itraconazole (Frangon do Brasil Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brazil), voriconazole (Pfizer), terbinafine (Pharma Nostra), anidulafungin (Pfizer), caspofungin (Merck, Darmstadt, Germany), and micafungin (Astellas, Chuo, Japan) were obtained commercially and diluted in dimethyl sulfoxide or distilled water, as recommended, to generate stock solutions. The concentrations of the antimicrobial agents tested were 0.03 to 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 1 to

512  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for the antibacterial and antifungal drugs, respectively. The MICs and minimal effective concentrations (MECs) were determined following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 guidelines (8), as adapted by Pereira et al. (9). The MICs were determined by visual observation and represent the inhibition of 100% of mycelium growth after 24 h of incubation at 37°C. The MEC endpoints for anidulafungin, caspofungin, and micafungin were defined as the lowest drug concentrations at which short, stubby, highly branched hyphae were observed after 24 h.

The interactions between the antibacterial and antifungal agents against the 30 strains were evaluated using the microdilution checkerboard method. The interpretation of the synergy testing results was determined as the lowest fractional inhibitory concentration index (FICI) of all of the nonturbid wells along the turbidity/nonturbidity interface (10) after 24 h of incubation at 37°C. FICI values were interpreted as follows: an FICI of  $\leq 0.5$ , synergism; an FICI of  $>0.5$  to  $\leq 4$ , indifference; and an FICI of  $>4$ , antagonism. The tests were performed in duplicate on different days. Off-scale MICs were converted to the next higher dilution for calculation purposes.

The *in vitro* susceptibilities of the 30 *P. insidiosum* isolates are listed in Table 1. The tested antibacterial drugs were considered the most effective drugs because they required the lowest concentrations for *in vitro* inhibition of *P. insidiosum*, with MIC (geometric mean [GM]) values in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ranging from 0.25 to 4 (0.91 and 0.79, respectively) for minocycline and tigecycline, 0.125 to 8 (1.91) for azithromycin, and 0.25 to 8 (1.38) for clarithromycin. The MIC (GM) values in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for the antifungal drugs ranged from 8 to 128 (34.3) for amphotericin B, 32 to 256 (94.79) for

Received 21 January 2014. Returned for modification 17 March 2014.

Accepted 28 June 2014.

Published ahead of print 7 July 2014.

Address correspondence to Janio M. Santurio, janio.santurio@gmail.com.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02349-14

Jesus et al.

TABLE 1 *In vitro* activities of selected antibacterial and antifungal drugs against 30 *Pythium insidiosum* isolates

Agent	Activity ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>			
	MIC range (GM)	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MEC range (GM)
<b>Antibacterials</b>				
Azithromycin	0.125–8 (1.91)	2	8	
Clarithromycin	0.25–8 (1.38)	2	4	
Minocycline	0.25–4 (0.91)	1	4	
Tigecycline	0.25–4 (0.79)	0.5	4	
<b>Antifungals</b>				
Amphotericin B	8–128 (34.3)	32	128	
Anidulafungin	512 to >512 (1,000.61)	>512	>512	256 to >512 (851.18)
Caspofungin	32–256 (94.79)	128	128	8–32 (20.63)
Itraconazole	256 to >512 (707.53)	>512	>512	
Micafungin	256 to >512 (776.04)	>512	>512	32–128 (64)
Terbinafine	4–128 (25.6)	32	64	
Voriconazole	256 to >512 (871.08)	>512	>512	

<sup>a</sup> GM, geometric mean; MEC, minimal effective concentration.

casposfungin, 4 to 128 (25.6) for terbinafine, 256 to >512 (707.53) for itraconazole, 512 to >512 (1,000.61) for anidulafungin, 256 to >512 for micafungin (776.04), and 256 to >512 (871.08) for voriconazole. The MEC (GM) values in  $\mu\text{g/ml}$  for the echinocandins were 256 to >512 (851.18) for anidulafungin, 8 to 32 (20.63) for casposfungin, and 32 to 128 (64) for micafungin.

The highest synergistic interactions based on the MIC values were observed for the combinations of clarithromycin and micafungin (73.33%), minocycline and amphotericin B (73.33%), minocycline and micafungin (70%), minocycline and itraconazole (70%), minocycline and terbinafine (66.67%), tigecycline and micafungin (66.67%), clarithromycin and amphotericin B (63.33%), clarithromycin and terbinafine (63.33%), clarithromycin and casposfungin (60%), minocycline and voriconazole (60%), and tigecycline and terbinafine (60%). The other combinations produced synergistic interactions ranging from 43.33% to 53.34%. The highest synergistic interactions based on the MEC values were observed for tigecycline and micafungin (73.33%), clarithromycin and micafungin (70%), azithromycin and micafungin (66.67%), and minocycline and micafungin (63.33%). Synergistic interactions ranging from 43.33% to 53.34% were observed for the other combinations.

At least one synergistic interaction was observed in combinations of minocycline or clarithromycin with the antifungal agents. Indifference in all the combinations of tigecycline or azithromycin with the antifungal drugs was observed in 20% and 13.3% of the isolates, respectively. Antagonistic interactions (MIC and MEC) were observed when azithromycin was combined with anidulafungin, amphotericin B, casposfungin, or itraconazole (3.33% each), clarithromycin-anidulafungin (3.33%), clarithromycin-casposfungin (3.33%), tigecycline-anidulafungin (3.33%), clarithromycin-itraconazole (6.67%), and minocycline-casposfungin (6.67%) (Table 2).

This study demonstrated that, individually, the antifungal drugs have weak or no *in vitro* antimicrobial activities compared with the clear *in vitro* inhibition against *P. insidiosum* by the selected antibacterial agents, for which the observed MIC GMs were <2  $\mu\text{g/ml}$ . Interestingly, considering a general review of the pharmacology of the antimicrobials in this study (11), we observed that the MIC/MEC GMs of the combined antimicrobials are compat-

ible with the plasma and tissue concentrations achieved by these drugs (Table 2).

The results of the effects of the single drugs found in this study are similar to those of previous studies that evaluated the susceptibility of *P. insidiosum* to antifungal (9, 12–15) and antibacterial (5, 6) drugs. The combination of antifungal agents against *P. insidiosum* showed the highest synergisms between terbinafine and amphotericin B (41.18% [14]), terbinafine and casposfungin (41.2% to 46.7% [12, 13]), terbinafine and fluconazole (41.2%), terbinafine and ketoconazole (29.4%), terbinafine and miconazole (11.8%) (13), terbinafine and itraconazole (17% to 40% [12, 15]), and terbinafine and voriconazole (17% [15]). Interestingly, these findings demonstrated that the combination of antifungal and antibacterial agents produces higher synergistic interactions than either produces alone, varying from 46.67% to 73.33% (minocycline plus antifungals) to 33.33% to 66.67% (tigecycline plus antifungals), 30% to 53.33% (azithromycin plus antifungals), and 43.33% to 73.33% (clarithromycin plus antifungals).

The favorable *in vitro* interactions of antibacterial and antifungal drugs against fungi have been observed since the 1970s, particularly with the synergism observed between amphotericin B with tetracycline or minocycline against *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Saccharomyces cerevisiae* (16, 17). Since then, several studies demonstrated the *in vitro* synergisms between amphotericin B or fluconazole with azithromycin, clarithromycin, doxycycline, minocycline, or tetracycline against *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Fusarium* spp. (18–23), as well as other combinations of antibacterial and antifungal agents against pathogenic fungi, as reviewed by Afeltra and Verweij (24) and Liu et al. (25).

Despite these favorable *in vitro* interactions, there are few or no *in vivo* or clinical data that support the use of such associations as the therapy of choice in the treatment of most fungal infections (24, 25). The different methods of interpreting the *in vitro* interactions between drugs (26) and the contradictory results observed in *in vitro* and *in vivo* correlations (27–29) may contribute to the divergent results, indicating the need for standardization of the methods used to evaluate the drug interactions.

Given that *Pythium* species are unable to synthesize their own sterols, which are essential for their reproduction (30), they must take up sterols from their plant or animal hosts. As already de-



TABLE 2. *In vitro* combinations of MIN, TIG, AZT, or CLT with AMB, ITZ, VRZ, TRB, AND, CSF, or MCF against 30 *Pythium insidiosum* isolates<sup>a</sup>

Drug combination	MIC <sup>b</sup>					MEC <sup>c</sup>					
	Range (GM) <sup>d</sup> (µg/ml)	ATF	ATF	ATF	ATF	Range (GM) <sup>d</sup> (µg/ml)	ATF	ATF	ATF	ATF	
MIN and TRB	0.06-0.5 (0.14)	0.25-32 (0.72)	0.03-2.18 (0.23)	66.67	33.33	0.00	NA <sup>e</sup>	NA	NA	NA	NA
MIN and AMB	0.03-1 (0.11)	0.5-16 (1.05)	0.03-2.5 (0.27)	73.33	26.67	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
MIN and ITZ	0.03-1 (0.17)	0.125-2 (0.35)	0.02-2.01 (0.20)	70.00	30.00	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
MIN and VRZ	0.125-2 (0.20)	0.5-256 (3.10)	0.05-1.5 (0.26)	60.00	40.00	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
MIN and MCF	0.06-0.5 (0.19)	0.5-64 (2.96)	0.05-1.13 (0.23)	70.00	30.00	0.00	0.03-0.5 (0.16)	0.5-64 (3.32)	0.08-1.13 (0.30)	63.33	36.67
MIN and CSF	0.06-0.5 (0.21)	0.5-8 (2.14)	0.08-2.04 (0.46)	46.67	53.33	0.00	0.06-0.5 (0.19)	0.5-8 (2.24)	0.13-4.81 (0.65)	46.67	46.66
MIN and AND	0.06-1 (0.23)	0.5-64 (3.32)	0.05-1.25 (0.28)	53.33	46.67	0.00	0.06-1 (0.22)	0.5-64 (3.82)	0.04-2.29 (0.33)	43.33	56.67
TIG and TRB	0.03-1 (0.15)	0.5-32 (0.74)	0.05-2.02 (0.27)	60.00	40.00	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
TIG and AMB	0.03-1 (0.15)	0.5-16 (0.85)	0.04-2.16 (0.32)	56.67	43.33	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
TIG and ITZ	0.06-0.5 (0.26)	0.25 (0.25)	0.02-2.01 (0.31)	46.67	53.33	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
TIG and VRZ	0.03-1 (0.31)	2-256 (2.35)	0.04-2.01 (0.40)	40.00	60.00	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
TIG and MCF	0.03-0.25 (0.15)	2-32 (2.30)	0.02-1.01 (0.20)	66.67	33.33	0.00	0.03-0.25 (0.11)	2-32 (2.46)	0.05-1.06 (0.21)	73.33	26.67
TIG and CSF	0.03-0.5 (0.19)	0.5-64 (2.35)	0.02-2.68 (0.45)	33.33	66.67	0.00	0.5-16 (2.09)	0.05-3.42 (0.53)	46.67	53.33	0.00
TIG and AND	0.03-0.5 (0.29)	2 (2)	0.02-2.01 (0.39)	40.00	60.00	0.00	0.03-0.5 (0.29)	0.05-2 (1.74)	0.02-4.01 (0.41)	43.34	53.33
AZT and TRB	0.125-4 (0.59)	0.5-32 (0.72)	0.05-2.16 (0.49)	33.33	66.67	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
AZT and AMB	0.03-4 (0.37)	0.5-32 (0.95)	0.05-4.13 (0.45)	40.00	56.67	3.33	NA	NA	NA	NA	NA
AZT and ITZ	0.03-4 (0.71)	0.25-32 (0.42)	0.02-8.01 (0.53)	30.00	66.67	3.33	NA	NA	NA	NA	NA
AZT and VRZ	0.125-4 (0.55)	2 (2)	0.02-2.01 (0.31)	53.33	46.67	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
AZT and MCF	0.03-2 (0.28)	2-128 (3.32)	0.02-2.01 (0.24)	53.33	46.67	0.00	0.03-1 (0.20)	2-64 (2.24)	0.05-1.81 (0.25)	66.67	33.33
AZT and CSF	0.03-4 (0.56)	0.5-64 (2.14)	0.02-2.03 (0.38)	50.00	50.00	0.00	0.03-1 (0.28)	0.5-32 (1.82)	0.09-8.07 (0.57)	43.34	53.33
AZT and AND	0.06-4 (0.76)	0.03-256 (2.7)	0.04-8.01 (0.48)	36.67	60.00	3.33	0.5-2.56 (2.24)	0.04-8.01 (0.41)	43.34	53.33	3.33
CLT and TRB	0.03-2 (0.20)	0.03-16 (0.66)	0.03-3.29 (0.24)	63.33	36.67	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
CLT and AMB	0.03-2 (0.16)	0.5-64 (0.89)	0.03-2.05 (0.24)	63.33	36.67	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
CLT and ITZ	0.125-4 (0.56)	0.25 (0.25)	0.04-4.01 (0.42)	43.33	50.00	6.67	NA	NA	NA	NA	NA
CLT and VRZ	0.06-1 (0.33)	2 (2)	0.04-2.01 (0.25)	56.67	43.33	0.00	NA	NA	NA	NA	NA
CLT and MCF	0.03-2 (0.20)	2-64 (2.24)	0.04-1.1 (0.17)	73.33	26.67	0.00	0.06-0.5 (0.18)	2 (2)	0.05-3.63 (0.21)	70.00	30.00
CLT and CSF	0.03-1 (0.18)	0.5-16 (2.41)	0.03-2.08 (0.28)	60.00	40.00	0.00	0.06-0.5 (0.16)	0.5-2 (1.82)	0.06-4.16 (0.47)	53.34	43.33
CLT and AND	0.06-2 (0.33)	2 (2)	0.04-4.01 (0.27)	50.00	46.67	3.33	0.06-2 (0.36)	2 (2)	0.04-4.01 (0.29)	46.67	50.00

<sup>a</sup> MIN, minocycline; TIG, tigecycline; AZT, azithromycin; CLT, clarithromycin; AMB, amphotericin B; ITZ, itraconazole; VRZ, voriconazole; TRB, terbinafine; AND, anidulafungin; CSF, caspofungin; MCF, micafungin.  
<sup>b</sup> GM, geometric mean; ATB, antibacterial; ATF, antifungal; FICI, fractional inhibitory concentration index; S, synergism; I, indifference; An, antagonism.  
<sup>c</sup> MEC, minimal effective concentration for echinocandins.  
<sup>d</sup> NA, not applicable.

Jesus et al.

scribed for non-*P. insidiosum* isolates, some sterol-targeting antifungal agents, while ineffective on mycelium grown in the absence of sterol, demonstrated antimicrobial activity in culture media containing cholesterol (31, 32). Conversely, the presence of cholesterol decreased the growth-inhibitory action of the antibacterial drugs that act by inhibiting the protein synthesis of *Pythium* isolates (33, 34). In this context, the possible changes in the permeability of the plasma membrane of *P. insidiosum* caused by antifungal drugs may facilitate the entry of antibacterial drugs in the cell, resulting in the synergistic interaction of these drugs.

These results have a direct impact on the clinical treatment of pythiosis because empirical therapy can be better adjusted in suspected cases of pythiosis before microbiological confirmation of the pathogen. The striking difference between the MICs of antibacterial and antifungal agents may suggest that the evaluated antibacterial drugs are a better treatment option than the antifungal drugs. However, further studies using models of experimental pythiosis are needed to reveal the therapeutic efficacies of the *in vitro* synergisms observed in this study, which can then be utilized to suggest the best treatment for pythiosis.

In conclusion, we found that the combination of azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline with antifungal agents may be an effective alternative in the treatment of pythiosis, because these combinations result in synergistic interactions. However, a small percentage of antagonistic interactions was observed, mainly in the combination of azithromycin or clarithromycin with echinocandins. Future studies should consider this antagonistic, though small, potential between antibacterial drugs and the echinocandins evaluated.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (grant 471221/2011-2 to J.M.S.).

F.P.K.J. and E.S.L. are financially supported by fellowships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES).

#### REFERENCES

- Gaastera W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L. 2010. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet. Microbiol.* 146:1–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.019>.
- Heath JA, Kiehn TE, Brown AE, LaQuaglia MP, Steinherz LJ, Bearman G, Wong M, Steinherz PG. 2002. *Pythium insidiosum* pleuropneumonitis complicating pneumonia in a child with leukemia. *Clin. Infect. Dis.* 35:60–64. <http://dx.doi.org/10.1086/342303>.
- Shenepe JL, English BK, Kaufman L, Pearson TA, Thompson JW, Kaufman RA, Frisch G, Rinaldi MG. 1998. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clin. Infect. Dis.* 27:1388–1393. <http://dx.doi.org/10.1086/515042>.
- Krajaeun T, Sathapatayavongs B, Pracharkam R, Nitiyanant P, Leelachai-lul P, Wanachawanawin W, Chairasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnau-wakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuan M, Somkaew S. 2006. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin. Infect. Dis.* 43:569–576. <http://dx.doi.org/10.1086/506353>.
- Loreto ES, Mario DAN, Denardi LB, Alves SH, Santurio JM. 2011. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3588–3590. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01586-10>.
- Mahl DL, de Jesus FPK, Loreto ES, Zanette RA, Ferreiro L, Ben Pilotto M, Alves SH, Santurio JM. 2012. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:4021–4023. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06073-12>.
- Botton SA, Pereira DIB, Costa MM, Azevedo MI, Argenta JS, Jesus FPK, Alves SH, Santurio JM. 2011. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. *Curr. Microbiol.* 62:1225–1229. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9781-4>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard—2nd ed. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Potter L, Spanemberg A, Ferreiro L. 2007. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:1168–1171. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm332>.
- Moody J. 2007. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods, p 1–23. In Garcia LS, Isenberg HD (ed), *Clinical microbiology procedures handbook*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
- Brunton L, Chabner B, Knollman B. 2011. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 12th ed. McGraw-Hill Professional, New York, NY.
- Argenta JS, Alves SH, Silveira F, Maboni G, Zanette RA, Cavalheiro AS, Pereira PL, Pereira DIB, Sallis ESV, Potter L, Santurio JM, Ferreiro L. 2012. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. *Vet. Microbiol.* 157:137–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.003>.
- Cavalheiro AS, Maboni G, de Azevedo MI, Argenta JS, Pereira DIB, Spader TB, Alves SH, Santurio JM. 2009. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2136–2138. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01506-08>.
- Cavalheiro AS, Zanette RA, Spader TB, Lovato L, Azevedo MI, Botton S, Alves SH, Santurio JM. 2009. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:767–769. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.036>.
- Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DIB, Cavalheiro AS, Spanemberg A, Ferreiro L. 2008. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:767–769. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01075-07>.
- Kwan CN, Medoff G, Kobayashi GS, Schlessinger D, Raskas HJ. 1972. Potentiation of the antifungal effects of antibiotics by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2:61–65. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.2.2.61>.
- Lew MA, Beckett KM, Levin MJ. 1978. Combined activity of minocycline and amphotericin B *in vitro* against medically important yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:465–469. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.14.3.465>.
- Hughes CE, Harris C, Peterson LR, Gerding DN. 1984. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp. by tetracycline analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:857–840. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.26.6.857>.
- Nguyen MH, Clancy CJ, Yu YC, Lewin AS. 1997. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by azithromycin against *Aspergillus* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16:846–848. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01700417>.
- El-Azizi M. 2007. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against the biofilms of non-albicans *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. *J. Med. Microbiol.* 56:645–649. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46952-0>.
- Shi WN, Chen ZZ, Chen X, Cao LL, Liu P, Sun SJ. 2010. The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: an *in vitro* interaction of antifungal and antibacterial agents. *FEMS Yeast Res.* 10:885–893. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00664.x>.
- Del Pozo JL, Frances ML, Hernandez S, Serrera A, Alonso M, Rubio MF. 2011. Effect of amphotericin B alone or in combination with rifampicin or clarithromycin against *Candida* species biofilms. *Int. J. Artif. Organs* 34:766–770. <http://dx.doi.org/10.5301/ijao.5000023>.
- Fiori A, Van Dijk P. 2012. Potent synergistic effect of doxycycline with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by interference with iron homeostasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:3785–3796. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06017-11>.

24. Afeltra J, Verweij PE. 2003. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22:397–407. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-003-0947-x>.
25. Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. 2014. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43:395–402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.12.009>.
26. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. 2002. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44:363–366. [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00473-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00473-X).
27. Ernst JD, Rusnak M, Sande MA. 1983. Combination antifungal chemotherapy for experimental disseminated candidiasis: lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* observations with amphotericin B and rifampin. *Rev. Infect. Dis.* 5(Suppl 3):S626–S630.
28. Nakajima R, Kitamura A, Someya K, Tanaka M, Sato K. 1995. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of EU-6359a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1517–1521. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.7.1517>.
29. Keceli SA, Willke A, Tamer GS, Boral OB, Sonmez N, Cagatay P. 2014. Interaction between caspofungin or voriconazole and cefoperazone-sulbactam or piperacillin-tazobactam by *in vitro* and *in vivo* methods. *APMIS* 122:412–417. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.12159>.
30. Hendrix JW. 1970. Sterols in growth and reproduction of fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 8:111–130. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.08.090170.000531>.
31. Child JJ, Defago G, Haskins RH. 1969. The effect of cholesterol and polyene antibiotics on the permeability of the protoplasmic membrane of *Pythium* PRL 2142. *Can. J. Microbiol.* 15:599–603. <http://dx.doi.org/10.1139/m69-102>.
32. Schlosser E, Gottlieb D. 1966. Sterols and sensitivity of *Pythium* species to filipin. *J. Bacteriol.* 91:1080–1084.
33. Ravn CD, Schwarz M. 1987. Protection of *Pythium* species against antibacterial antibiotics by cholesterol. *Phytopathology* 77:319–323. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-77-319>.
34. Ravn CD, Vanetten JL. 1978. Mechanism of antibacterial antibiotic sensitivity in *Pythium ultimum*. *J. Gen. Microbiol.* 108:133–139. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-108-1-133>.

## 4.2 Artigo 2

**Atividade *in vitro* de carvacrol e timol combinados com agentes antibacterianos ou antifúngicos contra *Pythium insidiosum***

**Artigo publicado na revista Journal de Mycologie Médicale**



Available online at  
**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



SHORT COMMUNICATION/COURTE COMMUNICATION

## In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*

*Activités in vitro d'associations de carvacrol et de thymol avec des antifongiques ou des antibiotiques contre Pythium insidiosum*

F.P.K. Jesus<sup>a</sup>, L. Ferreiro<sup>a</sup>, K.S. Bizzi<sup>b</sup>, É.S. Loreto<sup>b</sup>,  
M.B. Pilotto<sup>b</sup>, A. Ludwig<sup>b</sup>, S.H. Alves<sup>c</sup>, R.A. Zanette<sup>b</sup>,  
J.M. Santurio<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima n° 1000, Prédio 20, sala 4139, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

Received 29 May 2014; received in revised form 22 October 2014; accepted 30 October 2014

### KEYWORDS

Pythiosis;  
Susceptibility test;  
Combination of drugs;  
Carvacrol;  
Thymol

**Summary** We describe the in vitro activities of the combinations of carvacrol and thymol with antibiotics (azithromycin, clarithromycin, minocycline and tigecycline) and antifungal agents (amphotericin B, caspofungin, itraconazole and terbinafine) against 23 isolates of the oomycete *Pythium insidiosum*. The assays were based on the M38-A2 technique and checkerboard microdilution. Based on the mean FICI values, the main synergies observed were combinations of carvacrol + itraconazole and thymol + itraconazole (96%), thymol + clarithromycin (92%), carvacrol + clarithromycin (88%), thymol + minocycline (84%), carvacrol + minocycline (80%), carvacrol + azithromycin (76%), thymol + azithromycin (68%), carvacrol + tigecycline (64%) and thymol + tigecycline (60%). In conclusion, we found that combinations of carvacrol or thymol with these antimicrobial agents might provide effective alternative treatments for cutaneous pythiosis due to their synergistic interactions. Future in vivo experiments are needed to elucidate the safety and therapeutic potential of these combinations.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail address: [janio.santurio@gmail.com](mailto:janio.santurio@gmail.com) (J.M. Santurio).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.10.023>

1156-5233/© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Jesus FPK, et al. In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. Journal De Mycologie Médicale (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.10.023>

**MOTS CLÉS**

Pythiose ;  
Technique M38-A2 ;  
Test en damier ;  
Activités synergiques  
anti-*Pythium* ;  
Carvacrol ;  
Thymol

**Résumé** Au cours de cette étude, des activités antimicrobiennes ont été évaluées *in vitro* en combinant le carvacrol et le thymol avec des antibiotiques (azithromycine, clarithromycine, minocycline et tigécycline) ou des antifongiques (amphotéricine B, caspofungine, itraconazole et terbinafine) contre 23 isolats de l'oomycète *Pythium insidiosum*. Les essais ont été réalisés en microdilution selon les techniques standardisées M38-A2 et en damier. Après calcul des valeurs moyennes d'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FICI), il ressort que les principales activités synergiques anti-*Pythium* ont été observées pour les combinaisons d'itraconazole avec le carvacrol ou le thymol (96 %), de clarithromycine avec le thymol (92 %) ou le carvacrol (88 %), de minocycline avec le thymol (84 %) ou le carvacrol (80 %), d'azithromycine avec le carvacrol (76 %) ou le thymol (68 %), de tigécycline avec le carvacrol (64 %) ou le thymol (60 %). En conclusion, les combinaisons de carvacrol ou de thymol s'avèrent intéressantes grâce à leurs interactions synergiques avec des composés antimicrobiens dans l'élaboration de nouveaux traitements efficaces contre la pythiose cutanée. De futures expériences *in vivo* sont nécessaires pour confirmer en thérapie humaine le potentiel de ces combinaisons synergiques et s'assurer de leur innocuité.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Introduction**

Similar to other species of its genus, *Pythium insidiosum* is a species of oomycete that causes severe disease in plants [24]. *P. insidiosum*, however, also has the unusual ability to cause severe disease in humans and other mammals [12,32]. *P. insidiosum* is considered a pseudofungus because it produces hyaline hyphae similar to those of true fungi. Because of this, many attempts have been made to treat pythiosis using antifungal drugs. However, most of these treatments have been unsuccessful [17,31] because this species is unable to synthesize ergosterol, the main target of most antifungal drugs. As a result, there is currently no gold standard treatment for pythiosis.

The pythiosis cases are usually from regions of tropical and subtropical climate and are associated with human or animal contact with areas where there is accumulation of water (lakes and wetlands) at environmental temperature between 30 and 40 °C and there are zoospores of *P. insidiosum*. The biological cycle proposed for the *P. insidiosum* is based on the colonization of aquatic plants, which serve as a substrate for mycelial vegetative growth and asexual formation of biflagellate zoospores, which in the presence of a mammalian host, can cause the disease. The hyphae of *P. insidiosum* does not penetrate the intact skin, suggesting that the macro- or microscopic lesions are necessary for the infection to occur. There are no reports of transmission between mammalian hosts [12,22].

Surgery (aggressive surgical excision and amputation) is the most common treatment of the pythiosis. Unfortunately, complete surgical excision, often, is impossible due to the anatomical site of the lesions, resulting in a high rate of local recurrence. Because of this, surgical excision is frequently associated with antifungal therapy and immunotherapy, and the therapeutic success depends on rapid diagnosis and proper identification of the pathogen [12,17].

The antifungal activity of carvacrol and thymol, as well as their synergistic potential with antibiotics, has been described in a number of studies [1,6,15,18,26,28,29,37]. However, the *in vitro* susceptibility of *P. insidiosum* to carvacrol and thymol, alone or with antibiotics, has not been evaluated. Clinical

pythiosis can vary depending on the host. Cutaneous, gastrointestinal, vascular and systemic forms have been described [12]. Due to the limitations on oral or systemic administration of essential oils and derivatives [38], they may have a greater therapeutic potential against cutaneous and subcutaneous forms of pythiosis. In this context, this study aimed to assess the *in vitro* activity of carvacrol and thymol in combination with antibiotics or antifungal drugs.

**Material and methods**

We evaluated 23 Brazilian isolates of *P. insidiosum* from equine pythiosis cases, as well as the ATCC58637 and CBS 101555 reference strains. The identities of the isolates were confirmed using PCR [8]. Carvacrol (CRV, Sigma Aldrich®, St. Louis, USA) and thymol (THY, Sigma Aldrich®, St. Louis, USA) were diluted in ethanol ( $3.2 \times 10^4$  µg/mL stock solution) or distilled RPMI 1640® (working solution). Azithromycin (AZT, Pharma Nostra®, Rio de Janeiro, Brazil), clarithromycin (CLT, Genix®, Anápolis, Brazil), minocycline (MIN, Pharma Nostra®, Rio de Janeiro, Brazil), tigecycline (TIG, Pfizer®, New York, USA), amphotericin B (AMB, Sigma Aldrich®, St. Louis, USA), caspofungin (CAS, Merck®, Darmstadt, Germany), itraconazole (ITZ, Janssen Pharmaceutica®, São Paulo, Brazil), and terbinafine (TRB, Novartis®, Basel, Switzerland) were diluted in dimethyl sulfoxide or distilled water to generate stock solutions.

Susceptibility tests were performed according to the CLSI M38-A2 microdilution protocol [11], adapted according to Pereira et al. [30]. The interactions between carvacrol or thymol and antifungal agents or antibiotics were evaluated using a checkerboard test [13,27]. Synergy test results after 24 h of incubation at 37 °C were interpreted according to (a) the lowest fractional inhibitory concentration index (FICI) and (b) the mean FICI values for all of the non-turbid (clear) wells along the turbid/non-turbid growth interface. FICI values were defined as synergism when  $\leq 0.5$ , indifference when between  $> 0.5$  and 4 and antagonism when  $> 4$ . Each test was performed in duplicate. The high off-scale MICs were converted to the maximum concentration when needed.

**Table 1** In vitro activity of carvacrol and thymol, alone or in combination with selected antibiotic or antifungal drugs, against 23 isolates and 2 reference strains of *Pythium insidiosum*.  
 Activités in vitro de carvacrol et de thymol, seuls ou en association avec des antibiotiques ou des antifongiques, contre les 23 isolats et 2 souches de référence de *Pythium insidiosum*.

MIC range (GM)	Drug combination														
	Drugs	MIC associated range (GM)				FICI mean range (GM)				Interpretation (%)					
		#1		#2		#1		#2		Syn		Ind	Ant		
		#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2		
Carvacrol (CRV)	80	320 (180.4)	CRV + AMB	5	20 (10.6) + 0.5 (0.5)	nd	0.02	0.25 (0.08)	0.08	3.63 (0.56)	100	40.0	60.0	–	–
Thymol (THY)	160–320 (223.2)	THY + AMB	5–20 (13.9) + 0.03–2 (0.54)	nd	0.04–0.25 (0.10)	0.08–3.60 (0.61)	100	44.0	–	56.0	–	–	–	–	
Antifungal agents		CRV + CSP	5–20 (12.1) + 2–1 (2.06)	nd	0.05–0.16 (0.09)	0.23–1.69 (0.62)	100	41.0	–	56.0	–	–	–	–	
Amphotericin B (AMB)	4–128 (27.10)	THY + CAS	5–40 (11.5) + 2–8 (2.17)	nd	0.04–0.27 (0.08)	0.16–1.65 (0.62)	100	36.0	–	64.0	–	–	–	–	
Caspofungin (CAS)	32–256 (91.80)	CRV + ITZ	2.5–40 (13.9) + 0.25–0.5 (0.26)	nd	0.02–0.14 (0.09)	0.05–0.62 (0.30)	100	96.0	–	4.0	–	–	–	–	
Itraconazole (ITZ)	> 16	THY + ITZ	5–80 (21.7) + 0.25–1 (0.27)	nd	0.02–0.26 (0.11)	0.26–0.85 (0.38)	100	96.0	–	4.0	–	–	–	–	
Terbinafine (TRB)	8	128 (32.00)	CRV + TRB	5	40 (15.2) + 0.5 (0.5)	nd	0.01	0.25 (0.09)	0.12	2.11 (0.57)	100	32.0	68.0	–	–
Antibacterial agents		THY + TRB	10–40 (17.4) + 0.5 (0.5)	nd	0.05–0.27 (0.10)	0.06–3.72 (0.45)	100	48.0	–	52.0	–	–	–	–	
Azithromycin (AZT)	1–8 (2.79)	CRV + AZT	1.25–20 (11.5) + 0.03–0.5 (0.03)	nd	0.04–0.16 (0.08)	0.04–2.09 (0.27)	100	76.0	–	24.0	–	–	–	–	
Clarithromycin (CLT)	0.25–8 (1.56)	THY + AZT	5–40 (11.8) + 0.03–0.06 (0.03)	nd	0.02–0.27 (0.07)	0.03–2.09 (0.25)	100	68.0	–	32.0	–	–	–	–	
Minocycline (MIN)	0.25–4 (1.06)	CRV + CLT	1.25–40 (8.5) + 0.03–0.12 (0.03)	nd	0.02–0.27 (0.08)	0.03–2.11 (0.20)	100	88.0	–	12.0	–	–	–	–	
Tigecycline (TIG)	0.25–4 (0.74)	THY + CLT	1.25–40 (9.2) + 0.03–0.25 (0.04)	nd	0.02–0.16 (0.07)	0.06–1.52 (0.21)	100	92.0	–	8.0	–	–	–	–	
		CRV + MIN	1.25–20 (4.9) + 0.03–0.25 (0.04)	nd	0.03–0.19 (0.09)	0.05–3.01 (0.23)	100	80.0	–	20.0	–	–	–	–	
		THY + MIN	1.25–40 (7.6) + 0.03–0.25 (0.04)	nd	0.02–0.25 (0.09)	0.05–0.77 (0.20)	100	84.0	–	16.0	–	–	–	–	
		CRV + TIG	2.5–20 (7.2) + 0.03 (0.03)	nd	0.04–0.25 (0.11)	0.05–1.21 (0.34)	100	64.0	–	36.0	–	–	–	–	
		THY + TIG	1.25–40 (8.7) + 0.03–0.25 (0.04)	nd	0.02–0.25 (0.11)	0.05–2.06 (0.34)	100	60.0	–	40.0	–	–	–	–	

MIC: minimum inhibitory concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ); GM: geometric mean; #1: method 1: Lowest Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI); #2: method 2: mean FICI; nd: not determined.

## Results

In vitro susceptibilities of the 23 *P. insidiosum* isolates are listed in Table 1. Carvacrol and thymol MIC values geometric mean (GM) ranged from 80 to 320 µg/mL (GM 180.4) and 160 to 320 µg/mL (GM 223.2), respectively. The MIC values for the antifungal drugs ranged from 4 to 128 µg/mL (27.10) for AMB, 32 to 256 µg/mL (91.8) for CAS, > 16 for ITZ and 8 to 128 (32) for TRB. MIC values for the antibiotics ranged from 1 to 8 µg/mL (2.79) for AZT, 0.25 to 8 µg/mL (1.56) for CLT and 0.25 to 4 µg/mL (1.06 and 0.74) for MIN and TIG, respectively.

Regarding the lowest FICI for each combination, we observed that both CRV and THY exhibited synergism with each of the antibacterial and antifungal agents (Table 1). Based on the mean FICI values, the strongest synergistic interactions were: CRV + ITZ and THY + ITZ (96%), THY + CLT (92%), CRV + CLT (88%), THY + MIN (84%), CRV + MIN (80%), CRV + AZT (76%), THY + AZT (68%), CRV + TIG (64%) and THY + TIG (60%). The other combinations produced synergistic interactions ranging from 32 to 48% (Table 1). Antagonistic interactions were not observed.

## Discussion

This study provides the first demonstration of the in vitro antimicrobial activity of carvacrol and thymol, and of synergism when these compounds were combined with antibiotics or antifungal drugs. Individually, higher MICs against *P. insidiosum* were observed with carvacrol, thymol and the antifungal drugs than with the antibiotics. However, all combinations of CRV or THY with the other antimicrobial agents were synergistic. In particular, combinations with ITZ, AZT, CLT and MIN demonstrated synergies of greater than 60% based on the mean FICI values. Based on the lowest FICI observed for each combination, we conclude that at least one synergistic interaction was observed for all combinations evaluated.

In vitro, susceptibility testing of *P. insidiosum* should be adapted to the CLSI M38-A2 protocol because, unlike true fungi, this species does not form asexual spores or conidia in the solid culture media traditionally used in microbiology. Thus, the production of zoospores requires the use of a liquid induction medium [25]. Different interpretations of FICI values may result in different synergy profiles, as noted in the review by Bonapace et al. [7]. We employed two methods of interpreting the FICI values; with both interpretations, synergy against *P. insidiosum* was observed for combinations of CRV and THY with selected antibiotics.

Prior studies demonstrated the susceptibility of *P. insidiosum* to antifungal agents [4,9,10,30], antibiotics [20,21,23]<sup>1</sup> and compounds derived from plants and fungi [16,34–36] in vitro. However, tests of drug combinations were performed mainly with antifungal agents, which showed synergistic interactions of 11.8% to 46.7%, particularly when TRB was combined with other antifungal drugs

[3,4,9,10]. Interestingly, the combination of THY or CRV with these antibiotics resulted in high rates of synergy.

The observation of synergistic interactions between antifungals and non-antifungal agents has been demonstrated in several studies but is unusual the use of these combinations as the therapy of choice in the treatment of most fungal infections [2,19]. The variability in the results of in vitro activity of antimicrobials against *P. insidiosum* can be related to the phylogenetic diversity, particularly among clinical isolates of the Americas and Asia [5,14,33] as well as the different methods of implementation and interpretation used in these in vitro susceptibility tests [7,21]<sup>1</sup>. These observations suggest the need for a standardization of techniques and comparison of phylogenetically distinct isolates.

## Conclusion

In conclusion, we have demonstrated synergistic interactions for combinations of CRV or THY and AZT, CLT, MIN, TIG, AMB, CAS, ITZ or TRB, suggesting that these combinations might provide an effective alternative treatment for pythiosis. The documented efficacy and safety of these antimicrobial agents make them suitable for testing in animal models of disease, alone or in combination. These favorable properties also make them promising candidates as therapies for pythiosis.

## Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

## Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development, Brazil (CNPq grant number 471221/2011-2 to J.M.S.). F.P.K.J. and É.S.L. received fellowships from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (CAPES).

## References

- [1] Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J Mycol Med* 2014;24:e51–6.
- [2] Afeltra J, Verweij PE. Antifungal activity of non-antifungal drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:397–407.
- [3] Argenta JS, Alves SH, Silveira F, Maboni G, Zanette RA, Cavalheiro AS, et al. In vitro and in vivo susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol* 2012;157:137–42.
- [4] Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DIB, Cavalheiro AS, Spanemberg A, et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:767–9.
- [5] Azevedo MI, Botton SA, Pereira DIB, Robe LJ, Jesus FPK, Mahl CD, et al. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. *Vet Microbiol* 2012;159:141–8.

<sup>1</sup> Loreto ÉS, Tondolo JSM, Pilotto MB, Alves SA, Santurio JM. New insights into the in vitro susceptibility of *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; published ahead of print.



- [6] Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol* 2006;43:149–54.
- [7] Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44:363–6.
- [8] Botton SA, Pereira DIB, Costa MM, Azevedo MI, Argenta JS, Jesus FPK, et al. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. *Curr Microbiol* 2011;62:1225–9.
- [9] Cavalheiro AS, Maboni G, de Azevedo MI, Argenta JS, Pereira DIB, Spader TB, et al. In vitro activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2136–8.
- [10] Cavalheiro AS, Zanette RA, Spader TB, Lovato L, Azevedo MI, Botton S, et al. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol* 2009;137:408–11.
- [11] Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A2, . 2nd ed., Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008 [35 p].
- [12] Gastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J, et al. *Pythium insidiosum*: An overview. *Vet Microbiol* 2010;146:1–16.
- [13] Hsieh MH, Yu CM, Yu VL, Chow JW. Synergy assessed by checkerboard – a critical analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;16:343–9.
- [14] Kammarnjesadukul P, Palaga T, Sritunyaluksana K, Mendoza L, Krajaejun T, Vanittanakom N, et al. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). *Med Mycol* 2011;49:289–95.
- [15] Klaric MS, Kosalec I, Mastelic J, Pieckova E, Pepeljnak S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett Appl Microbiol* 2007;44:36–42.
- [16] Krajaejun T, Lowhnoo T, Yingyong W, Rujirawat T, Fucharoen S, Strobel GA. In vitro antimicrobial activity of volatile organic compounds from *Muscodor crispans* against the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012;43:1474–83.
- [17] Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* 2006;43:569–76.
- [18] Langeveld WT, Veldhuizen EJ, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol* 2014;40:76–94.
- [19] Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:395–402.
- [20] Loreto ES, Mario DAN, Denardi LB, Alves SH, Santurio JM. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3588–90.
- [21] Loreto ES, Tondolo JSM, Zanette RA, Alves SA, Santurio JM. Update on pythiosis immunobiology and immunotherapy. *World J Immunol* 2014;4:88–97.
- [22] Mahl DL, de Jesus FPK, Loreto ES, Zanette RA, Ferreiro L, Ben Pilotto M, et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4021–3.
- [23] Martin FN, Loper JE. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Crit Rev Plant Sci* 1999;18:111–81.
- [24] Mendoza L, Prendas J. A method to obtain rapid zoosporegenesis of *Pythium insidiosum*. *Mycopathologia* 1988;104:59–62.
- [25] Mohammadi A, Nazari H, Imari S, Amrollahi H. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. *J Mycol Med* 2014;24:e1–8.
- [26] Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Garcia LS, Isenberg HD, editors. *Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd ed., Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 1–23.
- [27] Mugnaini L, Nardoni S, Pinto L, Pistelli L, Leonardi M, Pisseri F, et al. In vitro and in vivo antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporum canis*. *J Mycol Med* 2012;22:179–84.
- [28] Nardoni S, Mugnaini L, Pistelli L, Leonardi M, Sanna V, PERRUCCI S, et al. Clinical and mycological evaluation of an herbal antifungal formulation in canine Malassezia dermatitis. *J Mycol Med* 2014;24:234–40.
- [29] Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Potter L, Spanemberg A, et al. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1168–71.
- [30] Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, de Azevedo MI, Silveira F, da Costa FF, et al. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. *J Mycol Med* 2008;18:129–33.
- [31] Rodrigues A, Graca DL, Fontoura C, Cavalheiro AS, Henzel A, Schwendler SE, et al. Intestinal dog pythiosis in Brazil. *J Mycol Med* 2006;16:37–41.
- [32] Schurko AM, Mendoza L, Levesque CA, Desaulniers NL, De Cock WAM, Klassen GR. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycol Res* 2003;107:537–44.
- [33] Sriphana U, Thongsri Y, Ardwichai P, Poopasit K, Prariyachatigul C, Simasathiansophon S, et al. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. *Fitoterapia* 2013;91:39–43.
- [34] Sriphana U, Thongsri Y, Prariyachatigul C, Pakawatchai C, Yenjai C. Clauraila E from the roots of *Clausena hammandiana* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. *Arch Pharm Res* 2013;36:1078–83.
- [35] Suthiwong J, Sriphana U, Thongsri Y, Promsuwan P, Prariyachatigul C, Yenjai C. Coumarinoids from the fruits of *Micromelum falcatum*. *Fitoterapia* 2014;94:134–41.
- [36] Tabassum N, Vidyasagar GM. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *Int J Pharm Pharmaceut Sci* 2013;5:19–28.
- [37] Tisserand R, Young R. *Essential oil safety: a guide for health care professionals*. Second edition ed. London, UK: Churchill Livingstone; 2014 [784 p].

### 4.3 Artigo 3

**Susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Pythium insidiosum* frente minociclina, azitromicina, claritromicina, tigeciclina em monoterapia e em associação**

**Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Antimicrobial chemotherapy**

**Title:** Susceptibility *in vitro* and *in vivo* *Pythiuminsidiosum* front minocycline, azithromycin, clarithromycin, tigecycline monotherapy and in combination

**Authors:** Francielli P. K. Jesus<sup>1</sup>, Laerte Ferreiro<sup>1</sup>, Érico S. Loreto<sup>2</sup>, Sydney H. Alves<sup>3</sup>, David Driemeier, Suyene O. Souza, Raquele T. França, Sonia T. A. Lopes, Pedro A. Hecktheuer, Maiara B. Pilotto, Aline Ludwig, Maria I. Azevedo<sup>1</sup>, Tatiana C. Ribeiro<sup>2</sup>, Juliana S. M. Tondolo<sup>2</sup>, Janio M. Santurio<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

**\*Address for correspondence:**

Janio M. Santurio

*Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima n° 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: [janio.santurio@gmail.com](mailto:janio.santurio@gmail.com)*

## Introduction

*Pythium insidiosum* is an eukaryotic organism that grew forming filamentous structures related to true fungi mycelia and this morphological similarity naturally directed toward the treatment of many pythiosis cases in humans and other mammals with antifungal drugs.<sup>1</sup> Despite some few reports of therapy success with antifungal drugs,<sup>2, 3</sup> many other studies demonstrated the ineffectiveness of such therapy.<sup>1, 4-6</sup> Previously, we described antibacterials belonging to the classes of glycylicyclines, macrolides and tetracyclines<sup>7-10</sup> as having potent *in vitro* activity against *P. insidiosum*. The present study investigated the *in vitro* and the *in vivo* interactions among minocycline, azithromycin, clarithromycin and tigecycline against *P. insidiosum*.

## Material and methods

### *Microorganisms and in vitro antimicrobial susceptibility*

We evaluated the susceptibility of twenty-eight Brazilian *P. insidiosum* strains isolated from equine pythiosis lesions<sup>11</sup> and two reference strains, *P. insidiosum* CBS 101555 and ATTC 58.637. A CLSI M38-A2 based *in vitro* susceptibility and the synergism tests were performed as previously described.<sup>9</sup> Azithromycin and minocycline (Pharma Nostra<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brazil), clarithromycin (Genix<sup>®</sup>, Anápolis, Brazil), and tigecycline (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA) were purchased as standard antimicrobial powders.

### *In vivo study in an animal model*

We assessed the efficacy of azithromycin and minocycline (Pharma Nostra<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brazil), clarithromycin (Genix<sup>®</sup>, Anápolis, Brazil), and tigecycline (Pfizer<sup>®</sup>,

New York, USA) alone and in combination in a rabbit subcutaneous infection model.<sup>12</sup> Eighty-eight 3-month-old New Zealand rabbits were divided into sixteen groups; eight groups (n=6) included animals with induced experimental pythiosis treated with minocycline, azithromycin, clarithromycin, tigecycline, minocycline + azithromycin, minocycline + clarithromycin, minocycline + tigecycline and a control without antimicrobial treatment. The remain eight groups (n=5) were not infected with the experimental disease and were treated with the same drug regimens already established for the infected animals. The treatment with oral azithromycin (20 mg/kg/day twice daily), clarithromycin (20 mg/kg/day twice daily), minocycline (10 mg/kg/day twice daily) and peritoneal tigecycline (1.5 mg/kg/day twice daily) began twenty-one days after inoculation. All animals were treated for ten weeks.

The lesion's subcutaneous nodular areas (cm<sup>2</sup>) in groups experimentally infected were determined at intervals of seven days after the beginning of the treatments using a calliper and measuring the longitudinal and transverse lengths of the lesions. Blood samples from all animals were collected from the lateral saphenous vein before inoculation of animals, before the start of treatment (day 0) and after thirty and sixty days after the start of treatment. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine and urea were determined in a semi-automatic analyzer (BA-88A, Mindray<sup>®</sup>, China) using commercial kits (Labtest<sup>®</sup> Diagnóstica S.A., Brazil), a hematological analysis/complete blood count (BC-2800 Vet Auto Hematology Analyzer Mindray<sup>®</sup>, China) performed and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)<sup>13</sup> were carry out for the determination of the anti-*P. insidiosum* antibody levels.

At the end of the experiment, all the animals were euthanized through deepening of anesthesia using thiopental (60 mg/kg) and representative tissue from the

subcutaneous skin lesion region, lung and kidney were subjected for further microbiological culture in Sabouraud dextrose agar, directly detection of *P. insidiosum* DNA by nested polymerase chain reaction (nPCR) assay<sup>11</sup> and histopathological analysis<sup>1</sup>. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil.

### ***Statistical analysis***

All data are represented as mean  $\pm$  SEM and were subjected to logarithmic transformation to obtain homogeneity between groups and two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak's test were performed to check the difference between groups. All analyses were performed using Sigma Plot 12.5 software. Significant difference was established at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### ***In vitro susceptibility***

The results of the *in vitro* susceptibility test are shown in Table 1. The MICs (geometric mean MICs, in mg/L) ranged from 0.125 to 8 (1.91) for azithromycin, 0.5 to 8 (1.38) for clarithromycin, 0.25 to 4 (0.91) for minocycline and 0.25 to 4 (0.79) for tigecycline. The MIC values at which 90% of the strains were inhibited (MIC<sub>90</sub>) was 8 mg/L for azithromycin and 4 mg/L for clarithromycin, minocycline and tigecycline. The interpretation of the combination of drug's testing results was based on the lowest fractional inhibitory concentration index (FICI) and demonstrated synergism (percentage of synergic interactions) for the following combination:

minocycline+azithromycin	(93.3%),	minocycline+clarithromycin	(93.3%),
minocycline+tigecycline	(86.67%),	tigecycline+azithromycin	(66.6%),

tigecycline+clarithromycin (60%) and azithromycin+clarithromycin (70%). Antagonistic interactions were not observed.

### ***Treatment of experimentally induced pythiosis with antibacterials***

The mean and standard error of subcutaneous lesion nodular areas (cm<sup>2</sup>) of the groups are represented on the Figure 1. Three animals died in the sixth (n=2) and ninth (n=1) week from the untreated group (n=6). Pythiosis with metastasis in the lungs were pointed as *causa mortis* by necropsy and histopathological analysis. All remaining animals from untreated and treated groups were followed until the end of the experiment. Clinical cure, i.e., complete remissions of subcutaneous lesions were observed in animals from group's minocycline (n=1/6 in 4<sup>th</sup> week), minocycline+clarithromycin (n=1/6 in 7<sup>th</sup> week), minocycline+tigecycline (n=1/6 in 7<sup>th</sup> week; n=1/6 in 8<sup>th</sup> week), minocycline+azithromycin (n=3/6 in 7<sup>th</sup> week; n=1/6 in 10<sup>th</sup> week) and azithromycin (n=1/6 in 5<sup>th</sup> week; n=1/6 in 6<sup>th</sup> week; n=1/6 in 8<sup>th</sup> week. n=2/6 in 10<sup>th</sup> week) between the fourth and tenth week of treatment.

### **Biochemical and haematological**

The main biochemical and haematological data from all treatment groups at thirty and sixty days of treatment are shown in Table 2 and 3. Rabbits with pythiosis had elevated counts of white blood cells (WBC). Interestingly, at 60<sup>th</sup> treatment day, the WBC from azithromycin and minocyclin+azithromycin groups were statistically different from the control group and similar to healthy animals. No statistically significant differences were observed in Red blood cells (RBC) and despite some other punctual differences, in an overview analysis of the hemoglobin concentration and in levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea and

creatinine, no evident alteration or toxicity were observed regarding the disease or treatment.

### **ELISA, nPCR, histopathologic and morphometric analysis**

Based on results of ELISA, nPCR and histopathological analysis (Table 4), it is evident that the groups treated with azithromycin and minocycline+azithromycin stands out for presented themselves as absence or significant reduction of fungal load and reducing the concentration of anti-*P. insidiosum* antibodies. Although the histological aspects of the lesions were similar in all groups, there was variation in the number of *P. insidiosum* hyphae when evaluated by Grocott's stain. The histopathology of the lesions stained with H&E revealed the presence of multifocal to coalescent necrotic areas, which were delimited by inflammatory infiltrates that predominantly consisted of polymorphonuclear lymphocytes. The use of Grocott's stain resulted in the observation of irregular hyphae like structures that were ramified and occasionally septate. In addition, these structures had thick brown walls and were primarily located in the centre of pyogranulomas (Figure 2).

### **Discussion**

In the present study, we compared, *in vitro* and *in vivo*, the effects of azithromycin, clarithromycin, minocycline and tigecycline alone or in association against *P. insidiosum* isolates. Our *in vitro* results showed that all these antibacterials were able to inhibit the *In vitro* growth of *P. insidiosum* as well as all combination resulted *in vitro* synergistic interactions (> 60%), particularly in presence of minocycline, for which > 86% of synergic interactions were observed. In this context, minocycline was chosen as the main antibiotic for the alone or in association *in vivo*.



The results from *in vitro* susceptibility test were in accordance with previously studies.<sup>7-10</sup> *In vivo*, earlier evaluation using induced pythiosis in rabbits demonstrated that caspofungin (1 mg/kg/day),<sup>14</sup> some combinations of terbinafine (125 mg/day) with itraconazole (5 mg/kg/day), fluvastatin (1 mg/kg/day) or caspofungin (1 mg/kg/day),<sup>15</sup> and a vortexed immunotherapeutic (30 mg at 14-day intervals)<sup>12, 16</sup> presented a fungistatic activity, i.e., the progression of subcutaneous lesions was less than the untreated group for some therapies but complete remission of the lesions was not a prevalent observation. In our study, excluding the monotherapy with clarithromycin, all the other therapies reduced the progression of subcutaneous lesions when compared with control. However, azithromycin was remarkably effective, with complete remission of the lesions of 66.6% and 83.3% of the animals with the combination therapy with minocycline or as monotherapy, respectively.

The results described here suggest that most of the evaluated antibiotics merit attention as new candidates for the treatment of pythiosis infections. Nevertheless, it is important to note some limitations of this study: a) at this moment, rabbits are the only animals in which the experimental pythiosis may be reproduced. However, rabbits are not a natural host of the disease; b) all treated animals had lesions with less than 30 days of evolution. Typically, cases of pythiosis respond better to treatment when the lesions are younger whereas an unfavorable diagnosis can be seen as increasing the time to disease progression; c) the prolonged time of treatment with antibacterials may be contraindicated depending on another host underlying diseases; d) the therapeutic response may be different depending on the tissue or organ affected by disease.

It is probable that the mechanism of antimicrobial action against *P. insidiosum* of macrolides and tetracyclines in this study is similar to that observed against bacteria, i.e., inhibition of protein synthesis. Interestingly, among the pharmacological

characteristics of these compounds,<sup>17</sup> it is emphasized that azithromycin, at therapeutic doses, produce tissue concentrations above 3 mg/kg in a variety of tissues, although has low plasma concentration (0.4 mg/L).<sup>18</sup>

Further studies including a larger number of isolates, particularly from genetically diverse *P. insidiosum* strains, different drug regimens treatments and association with other antimicrobial, immunotherapy and surgery will provide a better understanding of the therapeutic potential of azithromycin, minocycline and tigecycline in pythiosis therapy.

To the best of our knowledge, this study represents the first evaluation of the use of antibacterials against *P. insidiosum* in an experimental model of disease. Particularly, azithromycin possesses potent *in vivo* activity against subcutaneous lesion and presents an interesting potential as a novel anti-*Pythium* therapeutic option.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development -CNPq (grant number 471221/2011-2 to J. M. S.). F.P.K.J. and É.S.L are financially supported by fellowships from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (CAPES).

### **Transparency declarations**

None to declare.

### **References**

1. Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM *et al.* *Pythium insidiosum*: An overview. *Vet Microbiol* 2010; **146**: 1-16.

2. Heath JA, Kiehn TE, Brown AE *et al.* *Pythium insidiosum* pleuropericarditis complicating pneumonia in a child with leukemia. *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 60-4.
3. Shenep JL, English BK, Kaufman L *et al.* Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clin Infect Dis* 1998; **27**: 1388-93.
4. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R *et al.* Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 569-76.
5. Sathapatayavongs B, Leelachaikul P, Prachaktam R *et al.* Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. *J Infect Dis* 1989; **159**: 274-80.
6. Permpalung N, Worasilchai N, Plongla R *et al.* Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. *J Antimicrob Chemother* first published online January 27, 2015 doi:10.1093/jac/dkv008.
7. Loreto ES, Mario DAN, Denardi LB *et al.* *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3588-90.
8. Mahl DL, de Jesus FPK, Loreto ES *et al.* *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4021-3.
9. Jesus FP, Ferreira L, Loreto ES *et al.* *in vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 5621-5.

10. Loreto ÉS, Tondolo JSM, Pilotto MB *et al.* New insights into the *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 7534-7.
11. Botton SA, Pereira DIB, Costa MM *et al.* Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. *Curr Microbiol* 2011; **62**: 1225-9.
12. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM *et al.* Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated. *Vaccine* 2003; **21**: 2535-40.
13. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM *et al.* Indirect ELISA for the serodiagnostic of pythiosis. *Pesq Vet Bras* 2006; **26**: 47-50.
14. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH *et al.* Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 1168-71.
15. Argenta JS, Alves SH, Silveira F *et al.* *in vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol* 2012; **157**: 137-42.
16. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH *et al.* Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. *J Mycol Med* 2008; **18**: 129-33.
17. Chambers HF, Deck DH. Tetracyclines, Macrolides, Clindamycin, Chloramphenicol, Streptogramins, & Oxazolidinones In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, eds. *Basic & Clinical Pharmacology*. New York: McGraw-Hill Medical, 2009; 795-806.
18. Foulds G, Shepard RM, Johnson RB. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *J Antimicrob Chemother* 1990; **25**: 73-82.

Table 1. *in vitro* combinations of azithromycin (AZT), clarithromycin (CLT), minocycline (MIN) and tigecycline (TIG) against 30 *Pythium insidiosum* isolates.

MIC <sup>a</sup> Range( <sup>b</sup> GM)	COMBINATION							
	Drug combination	<sup>c</sup> FIC Range (GM)		<sup>d</sup> FICI Range (GM)	Interpretation (%)			
		ATB 1	ATB 2		S	I	An	
	<b>MIN + TIG</b>	0.03 – 1 (0.11)	0.03- 0.5 (0.05)	0.05 – 0.62 (0.23)	86.67	13.33	0.00	
<b>MIN</b>	0.25 – 4 (0.91)	<b>MIN + CLT</b>	0.03 – 0.5 (0.06)	0.03 - 1 (0.07)	0.05 – 0.06 (0.14)	93.33	6.67	0.00
<b>TIG</b>	0.25 – 4 (0.79)	<b>MIN + AZT</b>	0.03 - 1 (0.11)	0.03 – 0.5 (0.05)	0.04 – 0.51 (0.18)	93.33	6.67	0.00
<b>CLT</b>	0.5 – 8 (1.38)	<b>TIG + CLT</b>	0.03 - 1 (0.10)	0.03 – 0.5 (0.05)	0.02 – 2.2 (0.27)	60.00	40.00	0.00
<b>AZT</b>	0.125 – 8 (1.91)	<b>TIG + AZT</b>	0.03 - 1 (0.09)	0.03 – 1 (0.06)	0.03 - 2 (0.27)	66.67	33.33	0.00
		<b>CLT + AZT</b>	0.03 - 2 (0.12)	0.03 - 2 (0.12)	0.03 – 2.06 (0.26)	70.00	30.00	0.00

<sup>a</sup>MIC, minimal inhibitory concentration; <sup>b</sup>GM, geometric mean; <sup>c</sup>FIC, fractional inhibitory concentration; <sup>d</sup>FICI, fractional inhibitory concentration index; S, synergism; I, indifference; An, antagonism.

Table 2. Haematological parameter of rabbits with (Pythiosis) and without (Health) experimentally induced pythiosis treated with antibacterials.

Rabbits groups	White blood cells ( $\times 10^9/L$ )			Red blood cells ( $\times 10^6/mm^3$ )			Haemoglobin (g/dL)		
	0 <sup>th</sup> day*	30 <sup>th</sup> day	60 <sup>th</sup> day	0 <sup>th</sup> day*	30 <sup>th</sup> day	60 <sup>th</sup> day	0 <sup>th</sup> day*	30 <sup>th</sup> day	60 <sup>th</sup> day
<b>Health</b>									
<b>AZT</b>	10,24±0,47 Aa	11,82±1,33 Aa	10,42±0,93 Aa	10,24±0,47 Aa	11,82±1,33 Aa	10,42±0,93 Aa	12,16±0,34 Aa	15,06±0,32 Aa	14,36±0,41 Aa
<b>CLT</b>	9,02±1,69 Aa	11,82±1,41 Aa	10,42±1,60 Aa	9,02±1,69 Aa	11,82±1,41 Aa	10,42±1,60 Aa	12,74±0,24 Aa	14,36±0,13 Aa	14,00±0,21 Aa
<b>MIN</b>	7,68±0,55 Aa	8,88±0,26 Aa	9,64±0,80 Aa	7,68±0,55 Aa	8,88±0,26 Aa	9,64±0,80 Aa	13,22±0,53 Aa	14,64±0,42 Aa	12,78±0,75 Aa
<b>TIG</b>	7,64±0,68 Aa	9,80±0,75 Aa	10,26±1,26 Aa	7,64±0,68 Aa	9,80±0,75 Aa	10,26±1,26 Aa	12,50±0,32 Aa	13,58±0,27 Aa	13,98±0,22 Aa
<b>MIN+AZT</b>	7,84±0,71 Aa	8,12±0,64 Aa	9,50±0,38 Aa	7,84±0,71 Aa	8,12±0,64 Aa	9,50±0,38 Aa	15,06±0,32 Ba	15,00±0,60 Aa	14,74±0,39 Aa
<b>MIN+CLT</b>	9,28±1,95 Aa	10,70±1,74 Aa	10,48±1,05 Aa	9,28±1,95 Aa	10,70±1,74 Aa	10,48±1,05 Aa	14,36±0,13 Ba	13,96±0,38 Aa	13,74±0,42 Aa
<b>MIN+TIG</b>	7,64±0,69 Aa	8,68±1,38 Aa	10,58±1,12 Aa	7,64±0,69 Aa	8,68±1,38 Aa	10,58±1,12 Aa	14,64±0,42 Ba	12,28±0,75 Aa	12,36±0,74 Aa
<b>CONTROL</b>	8,24±0,74 Aa	8,22±0,52 Aa	8,32±0,32 Aa	8,24±0,74 Aa	8,22±0,52 Aa	8,32±0,32 Aa	12,18±0,52 Aa	13,68±0,41 Aa	13,90±0,67 Aa
<b>Pythiosis</b>									
<b>AZT</b>	10,483±1,10 Aa	18,20±5,30 Aa	18,58±6,59 Aa	10,483±1,10 Aa	18,20±5,30 Aa	18,58±6,59 Aa	13,30±0,44 Bb	15,40±0,41 Ba	13,60±0,42 Aa
<b>CLT</b>	9,73±1,19 Aa	24,30±5,37 Ab	18,11±4,88 Aa	9,73±1,19 Aa	24,30±5,37 Ab	18,11±4,88 Aa	12,96±0,44 Ba	14,60±0,22 Ba	12,93±0,50 Aa
<b>MIN</b>	1,46±1,31 Ab	26,66±3,66 Ab	28,98±3,97 Ab	1,46±1,31 Ab	26,66±3,66 Ab	28,98±3,97 Ab	11,28±0,32 Ab	11,80±0,41 Aa	12,40±0,44 Ab
<b>TIG</b>	14,63±2,67 Ab	12,61±2,79 Aa	79,66±7,96 Aa	14,63±2,67 Ab	12,61±2,79 Aa	79,66±7,96 Aa	12,50±1,32 Bb	15,31±0,23 Bb	13,90±0,61 Aa
<b>MIN+AZI</b>	12,86±1,24 Aa	16,61±3,85 Aa	13,20±3,83 Aa	12,86±1,24 Aa	16,61±3,85 Aa	13,20±3,83 Aa	11,25±0,27 Ab	12,33±0,37 Ab	12,06±0,68 Aa
<b>MIN+CLT</b>	10,216±1,19 Aa	12,90±1,37 Aa	13,28±3,071 Aa	10,216±1,19 Aa	12,90±1,37 Aa	13,28±3,071 Aa	9,53±1,06 Ab	12,16±0,55 Ab	10,90±1,01 Aa
<b>MIN+TIG</b>	11,98±1,72 Aa	11,06±1,90 Aa	9,50±1,89 Aa	11,98±1,72 Aa	11,06±1,90 Aa	9,50±1,89 Aa	10,98±0,61 Aa	12,38±0,82 Aa	12,40±0,30 Ab
<b>CONTROL</b>	10,63±2,26 Aa	23,96±6,39 Ab	26,66±5,29 Ab	10,63±2,26 Aa	23,96±6,39 Ab	26,66±5,29 Ab	12,16±0,34 Aa	15,06±0,32 Aa	14,36±0,41 Aa

AZT, azithromycin; CLT, clarithromycin; MIN, minocycline; TIG, tigecycline. Results are presented as mean ± stand error. Superscript letters were added to the parameters to indicate statistical differences. Values not sharing same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). Capital letters: different letters represent significant differences between the groups within the status (Health or Pythiosis), compared to the control; lowercase letters: different letters represent significant differences between groups of comparing status (Health and Pythiosis). \*, first day treatment with the selected antibacterials.

Table 3. Biochemical parameters of rabbits with (Pythiosis) and without (Health) experimentally induced pythiosis treated with antibacterials.

Rabbits groups	AST (U/L)			ALT (U/L)			Urea (mg/dL)			Creatinine (mg/dL)		
	0 <sup>th</sup> day <sup>*</sup>	30 <sup>th</sup> day	60 <sup>th</sup> day	0 <sup>th</sup> day <sup>*</sup>	30 <sup>th</sup> day	60 <sup>th</sup> day	0 <sup>th</sup> day <sup>*</sup>	30 <sup>th</sup> day	60 <sup>th</sup> day	0 <sup>th</sup> day <sup>*</sup>	30 <sup>th</sup> day	60 <sup>th</sup> day
<b>Health</b>	31,59 ± 2,28 Aa	37,48 ± 2,29 Aa	30,58 ± 3,02 Aa	41,18±3,42 Aa	44,26±5,12 Aa	43,22±4,56 Aa	44,20 ± 2,69 Aa	45,18 ± 0,76 Aa	44,30 ± 1,23 Aa	1,10 ± 0,10 Ba	1,08 ± 0,04 Ba	1,06 ± 0,09 Ba
<b>AZT</b>	35,42 ± 1,01 Aa	37,20 ± 2,25 Aa	33,43 ± 1,71 Aa	49,32±2,57 Aa	43,62±3,71 Aa	41,64±2,81 Aa	46,10 ± 3,53 Aa	44,08 ± 4,33 Aa	47,28 ± 1,63 Aa	1,30 ± 0,10 Aa	1,24 ± 0,06 Ba	1,28 ± 0,10 Aa
<b>CLT</b>	29,52 ± 2,52 Aa	27,36 ± 2,45 Aa	24,07 ± 2,74 Aa	32,52±1,96 Aa	23,24±1,97 Aa	24,06±1,84 Aa	47,52 ± 2,60 Aa	50,98 ± 3,04 Aa	49,82 ± 3,05 Aa	1,62 ± 0,15 Aa	1,56 ± 0,14 Aa	1,72 ± 0,14 Aa
<b>MIN</b>	34,03 ± 1,46 Aa	38,40 ± 1,98 Aa	34,99 ± 2,16 Aa	45,97±3,76 Aa	46,20±3,43 Aa	40,34±3,07 Aa	40,36 ± 1,83 Aa	43,90 ± 2,80 Aa	45,62 ± 1,44 Aa	0,94 ± 0,09 Ba	1,20 ± 0,11 Ba	1,08 ± 0,10 Ba
<b>TIG</b>	37,61 ± 2,50 Aa	30,58 ± 1,62 Aa	26,89 ± 1,98 Aa	41,00±2,87 Aa	38,12±3,41 Aa	33,34±3,53 Aa	45,02 ± 1,61 Aa	48,08 ± 3,37 Aa	42,08 ± 2,02 Aa	1,12 ± 0,09 Ba	1,02 ± 0,03 Ba	0,94 ± 0,09 Ba
<b>MIN+AZT</b>	36,19 ± 4,42 Aa	28,43 ± 2,79 Aa	29,92 ± 4,11 Aa	46,60±2,87 Aa	35,40±5,31 Aa	35,00±5,92 Aa	48,34 ± 4,29 Aa	46,60 ± 3,55 Aa	40,48 ± 6,75 Aa	1,34 ± 0,11 Aa	1,26 ± 0,12 Aa	1,18 ± 0,12 Aa
<b>MIN+CLT</b>	30,25 ± 2,53 Aa	19,77 ± 1,29 Aa	21,84 ± 1,40 Aa	25,24±2,70 Aa	14,98±2,27 Ba	17,06±2,73 Ba	49,60 ± 5,54 Aa	44,56 ± 5,66 Aa	46,58 ± 4,86 Aa	1,74 ± 0,26 Aa	1,30 ± 0,12 Aa	1,44 ± 0,14 Aa
<b>MIN+TIG</b>	30,58 ± 1,62 Aa	32,99 ± 5,18 Aa	30,84 ± 2,89 Aa	33,00±2,07 Aa	30,60±3,70 Aa	31,20±3,69 Aa	40,94 ± 3,74 Aa	36,79 ± 4,18 Aa	41,09 ± 1,66 Aa	1,61 ± 0,08 Aa	1,78 ± 0,12 Aa	1,68 ± 0,17 Aa
<b>CONTROL</b>												
<b>Pythiosis</b>	27,70±2,12 Aa	25,59±2,77 Ab	26,11±1,03 Aa	28,58±3,18 Aa	23,55±3,29 Bb	24,01±3,33 Ab	41,20±2,66 Aa	42,01±4,63 Aa	36,45±3,19 Aa	0,93±0,02 Ba	1,26±0,13 Aa	1,06±0,05 Aa
<b>AZT</b>	25,48±2,82 Aa	28,41±4,94 Aa	29,58±3,87 Aa	24,51±2,29 Ab	20,33±2,31 Ab	19,91±2,40 Ab	41,35±4,92 Aa	38,16±4,54 Aa	27,41±3,22 Aa	0,86±0,03 Bb	1,11±0,04 Aa	1,01±0,04 Aa
<b>CLT</b>	36,03±4,83 Ab	28,63±5,72 Aa	23,87±3,91 Aa	16,33±5,01 Ab	18,66±3,29 Aa	23,00±3,17 Aa	45,52±6,74 Aa	34,38±2,71 Ab	31,51±1,53 Ab	1,69±0,12 Aa	1,15±0,16 Aa	1,37±0,14 Aa
<b>MIN</b>	32,64±5,86 Aa	31,03±3,60 Aa	18,44±3,23 Ab	12,00±1,54 Ab	12,50±3,50 Ab	17,66±2,02 Ab	54,49±3,97 Ab	32,28±3,31 Ab	26,36±5,76 Ab	1,49±0,06 Ab	1,12±0,18 Aa	1,49±0,15 Ab
<b>TIG</b>	30,27±2,08 Ab	26,13±2,39 Aa	24,57±2,28 Aa	31,45±2,50 Ba	20,46±1,72 Ab	19,18±2,93 Ab	51,88±5,10 Aa	51,66±3,92 Ba	45,03±7,10 Aa	1,13±0,06 Ba	1,68±0,28 Ab	1,76±0,57 Ab
<b>MIN+AZT</b>	20,62±2,50 Aa	27,69±3,97 Aa	19,51±1,54 Aa	12,66±4,43 Ab	10,50±3,05 Ab	21,83±4,01 Ab	52,12±4,16 Aa	47,43±5,06 Aa	38,63±5,89 Aa	1,66±0,10 Ab	1,72±0,14 Bb	1,67±0,25 Ab
<b>MIN+CLT</b>	32,48±2,88 Aa	29,88±4,28 Aa	24,97±2,29 Aa	11,66±2,02 Ab	15,83±4,60 Aa	21,60±3,91 Aa	58,55±3,72 Aa	37,53±4,62 Aa	37,72±9,58 Aa	1,65±0,12 Aa	1,63±0,12 Aa	1,81±0,14 Aa
<b>MIN+TIG</b>	32,67±2,79 Ab	28,86±2,57 Aa	21,00±0,87 Ab	19,33±5,41 Ab	10,80±1,20 Ab	19,66±7,66 Ab	54,79±3,24 Ab	33,58±3,86 Aa	34,15±4,93 Aa	1,56±0,06 Aa	1,16±0,10 Ab	1,31±0,16 Aa
<b>CONTROL</b>	31,59 ± 2,28 Aa	37,48 ± 2,29 Aa	30,58 ± 3,02 Aa	41,18±3,42 Aa	44,26±5,12 Aa	43,22±4,56 Aa	44,20 ± 2,69 Aa	45,18 ± 0,76 Aa	44,30 ± 1,23 Aa	1,10 ± 0,10 Ba	1,08 ± 0,04 Ba	1,06 ± 0,09 Ba

ALT, Alanine aminotransferase; AST, Aspartate aminotransferase; AZT, azithromycin; CLT, clarithromycin; MIN, minocycline; TIG, tigecycline. Results are presented as mean ± stand error. Superscript letters were added to the parameters to indicate statistical differences. Values not sharing same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). Capital letters: different letters represent significant differences between the groups within the status (Health or Pythiosis), compared to the control; lowercase letters: different letters represent significant differences between groups of comparing status (Health and Pythiosis). \*, first day treatment with the selected antibacterials.

Table 4. Results from histopathological, Nested Polymerase Chain Reaction and culture analysis of mouse kidneys (K), lungs (L) and subcutaneous lesion (S) from rabbits infected with *Pythium insidiosum*. Different lower case letters indicate significant difference between times in the same group, while capital letters indicate significant difference between groups and disease control.

Groups	Grocott			Nested PCR			Culture positive (%)			ELISA		
	K	L	S	K	L	S	K	L	S	0 <sup>th</sup> day*	30 <sup>th</sup> day	60 <sup>th</sup> day
	Fungal load, 0-4 (mean ± SD)											
<b>AZT</b>	0	0± 0.00 <sup>A</sup>	0± 0.00 <sup>B</sup>	nd	nd	nd	-	-		0.165±0.006 <sup>Aa</sup>	0.139±0.022 <sup>Ab</sup>	0.112±0.022 <sup>Bb</sup>
<b>CLT</b>	0	0± 0.00 <sup>A</sup>	3.17 ± 0.40 <sup>A</sup>	nd	nd	5	nd	nd	4	0.170±0.011 <sup>Aa</sup>	0.179±0.037 <sup>Aa</sup>	0.163±0.038 <sup>Aa</sup>
<b>MIN</b>	0	0± 0.00 <sup>A</sup>	1.67 ± 0.42 <sup>A</sup>	nd	nd	4	nd	nd	3	0.188±0.035 <sup>Aa</sup>	0.169±0.031 <sup>Aa</sup>	0.150±0.025 <sup>Aa</sup>
<b>TIG</b>	0	0.17 ± 0.17 <sup>A</sup>	1.50 ± 0.56 <sup>A</sup>	nd	3	3	nd	nd	3	0.202±0.041 <sup>Aa</sup>	0.175±0.030 <sup>Aa</sup>	0.170±0.036 <sup>Aa</sup>
<b>MIN+AZT</b>	0	0± 0.00 <sup>A</sup>	0.83 ± 0.40 <sup>B</sup>	nd	nd	1	nd	nd	0	0.157±0.016 <sup>Aa</sup>	0.152±0.036 <sup>Aa</sup>	0.128±0.025 <sup>Ba</sup>
<b>MIN+CLT</b>	0	0± 0.00 <sup>A</sup>	1.00 ± 0.26 <sup>A</sup>	nd	nd	5	nd	nd	2	0.152±0.034 <sup>Aa</sup>	0.139±0.032 <sup>Aa</sup>	0.139±0.033 <sup>Ba</sup>
<b>MIN+TIG</b>	0	0.33 ± 0.28 <sup>A</sup>	1.50 ± 0.42 <sup>A</sup>	nd	nd	3	nd	nd	4	0.196±0.028 <sup>Aa</sup>	0.171±0.034 <sup>Aa</sup>	0.158±0.038 <sup>Aa</sup>
<b>Disease control</b>	0	1.17 ± 0.60 <sup>A</sup>	2.50 ± 0.43 <sup>A</sup>	1	3	6	nd	2	6	0.192±0.038 <sup>Aa</sup>	0.183±0.030 <sup>Aa</sup>	0.200±0.027 <sup>Aa</sup>

AZT, azithromycin; CLT, clarithromycin; MIN, minocycline; TIG, tigecycline; K: kidney, L: lung, S: subcutaneous lesion. nested polymerase chain reaction (nPCR). Superscript letters were added to the parameters to indicate statistical differences. Values not sharing same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). \* Twenty-one days post infection. Capital letters: different letters represent significant differences between the groups within the status (Health or Pythiosis), compared to the control; lowercase letters: different letters represent significant differences between groups of comparing status (Health and Pythiosis). nd: not detected.



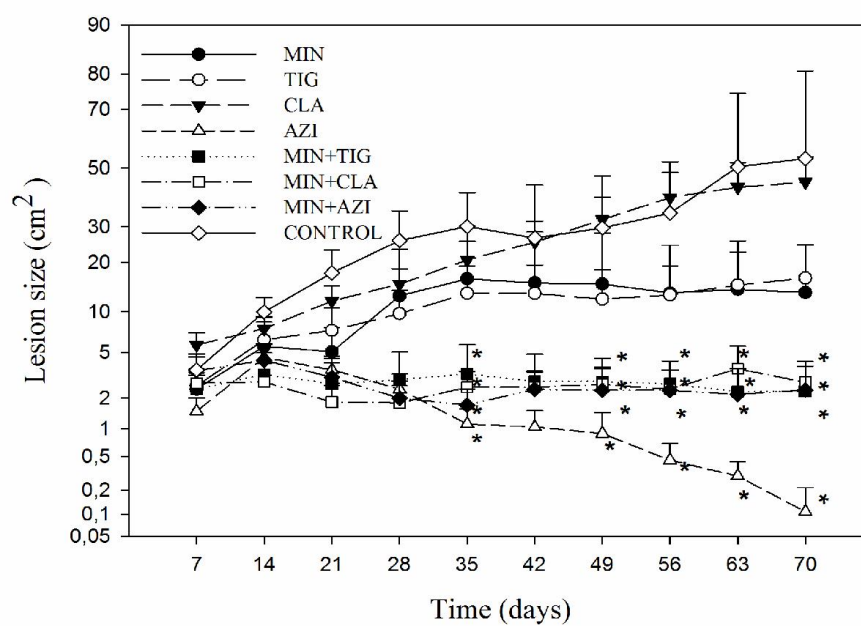


Figure 1. Variation in the size of the lesions in rabbits inoculated experimentally with *Pythium insidiosum* zoospores and receiving alone and combination antibiotic therapy.

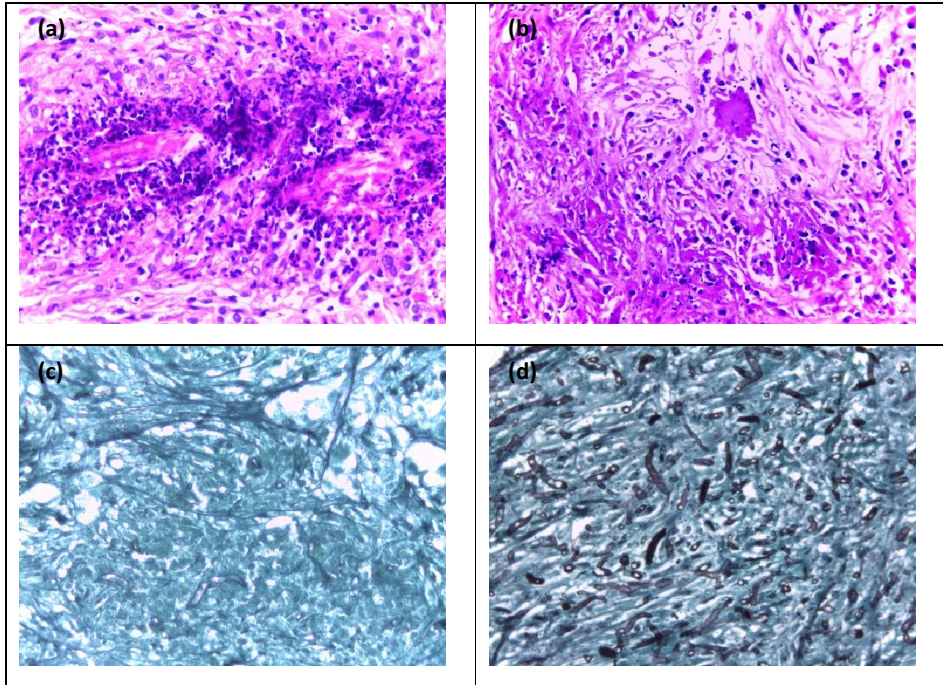


Figure 2. For estimation of inflammatory responses, slices were stained with haematoxylin-eosin stain (H&E) (figures a and b, respectively). Quantification of tissue burden of organisms and inflammatory responses in skins of animals infected with *P. insidiosum*. A scoring system of 0–5 for each parameter was developed. For quantification of fungal load, skins slices were stained by methenamine-silver stain and scored as 0 (if no filaments were visible) or as 1 to 5 (figures c and d, respectively). Magnification 400x. Five fields.

## 5. DISCUSSÃO

As infecções causadas pelo oomiceto *Pythium insidiosum* em humanos e animais são de difícil tratamento, podendo levar à amputação da região afetada ou até mesmo a morte do paciente. *P. insidiosum* tem se mostrado pouco susceptível à maioria dos fármacos antifúngicos, tanto em ensaios *in vitro* quanto em infecções experimentais (PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2008; CAVALHEIRO, et al., 2009a; LORETO et al., 2011; ZANETTE et al., 2014; LORETO et al., 2014). Contudo, há relatos de cura clínica, utilizando-se fármacos antifúngicos combinados e aliado a remoção cirúrgica (BISSONNETTE et al., 1991; SHENEP et al., 1998; MENDONZA et al., 2004; PEREIRA et al., 2013; PERMPALUNG et al., 2015).

Ao analisar os casos reportados por Mendonza et al. (2005) de pitiose em humanos com cura clínica, observou-se que ao menos duas semanas de antibioticoterapia prévia ao diagnóstico foi realizada, e o tratamento com antifúngico foi basicamente anfotericina B e iodeto de potássio. Dos cinco casos reportados três evoluíram a morte e dois a cura, destes apenas um não necessitou remoção cirúrgica aliada ao tratamento, curiosamente o paciente que recebeu antibioticoterapia por período mais prolongado. O outro caso que obteve sucesso terapêutico, por suspeitar-se de um abscesso bacteriano, teve seu tratamento sustentado em antibioticoterapia com meticilina e após um mês foi associado à anfotericina B.

Bissanotte et al. (1991), relataram cura em um felino com pitiose na região periorbital, com o uso de terapia com itraconazol e cetoconazol, no entanto associado a esta terapia relataram o uso tópico de uma solução contendo associação tripla de antibacterianos. Shene et al. (1998) também relatam cura em um menino de dois anos que após trauma ocorrido enquanto brincava na lama de um lago, desenvolveu celulite periorbital causada por *P. insidiosum*. O tratamento iniciou-se com cefotaxima intravenosa e sulfametoxazol trimetoprima, com o agravamento das lesões foi substituído para associação tripla de antibacterianos (vancomicina, clindamicina e cefotaxima). Após confirmação do diagnóstico de pitiose o tratamento foi alterado para anfotericina B em altas doses e foi não responsivo, sendo substituído por itraconazol (13 meses) e terbinafina (12 meses) e confirmada a cura 1,5 anos após término do tratamento.

Reforçando que a maioria dos antifúngicos age sobre o ergosterol, *P. insidiosum* (que não contém ergosterol), tem seu crescimento inibido em altas concentrações de drogas antifúngicas de forma isolada, no entanto quando associadas com fármacos antibacterianos, tem suas concentrações inibitórias diminuídas, demonstrando que o poder inibitório dos antibacterianos, tanto isolado como associado a outras drogas, sobre o crescimento de *P. insidiosum* corrobora ser um importante dado para o tratamento da pitiose. Os relatos de cura na administração concomitante de antibacterianos e antifúngicos, mesmo que não explícitos aliado aos achados realizados nos estudos de Loreto et al. (2011) e Mahl et al. (2012) com *P. insidiosum*, levaram ao estudo das interações das associações de antibacterianos a antifúngicos (JESUS et al., 2014a).

A comparação da variação das médias geométricas (MG), das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações efetivas mínimas (CEMs) quando comparado as MG das concentrações inibitórias fracionárias (CIFs) nas associações de antibacterianos com antifúngicos foram respectivamente para a azitromicina (1,91 µg/mL; 0,28 – 0,76 µg/mL); claritromicina (1,38 µg/mL; 0,16 – 0,56 µg/mL), minociclina (0,91 µg/mL; 0,11 – 0,23 µg/mL), tigeciclina (0,79 µg/mL; 0,16 – 0,56 µg/mL), anfotericina-B (CIM: 34,3 µg/mL; CIF: 0,89 – 1,05 µg/mL), terbinafina (25,6 µg/mL; CIF: 0,66 – 0,72 µg/mL), itraconazol (797,53 µg/mL; 0,25 – 0,42 µg/mL), voriconazol (871,08 µg/mL; 2,0 – 3,10 µg/mL), caspofungina (CEM: 20,63 µg/mL; CIM: 94,79 µg/mL; CIF: 2,14 – 2,41 µg/mL), micafungina (CEM: 64 µg/mL; CIM: 776,04 µg/mL; CIF: 2,24 – 2,96 µg/mL) e anidulafungina (CEM: 851,18 µg/mL; CIM: 1000,61 µg/mL; CIF: 2,0 – 3,32 µg/mL), demonstram marcada diminuição nas CIFs quando comparadas as CIMs, indicando sinergismo, quanto a associação de drogas.

As variações nas CIMs obtidas neste estudo com antifúngicos foram de 8 a 128 µg/mL para a anfotericina B; 512 a > 512 µg/mL para a anidulafungina; 32 -256 µg/mL para a caspofungina; 256 - >512 µg/mL para o itraconazol; 250 a >512 µg/mL para a micafungina e 4 a 128 µg/mL para a terbinafina. As concentrações inibitórias alcançadas foram superiores quando comparadas aos dados reportados na literatura que demonstraram CIMs, com 100% de inibição do crescimento, variando de 16 a 32 µg/mL para itraconazol e voriconazol, 4 a 32 µg/mL para a terbinafina (FONSECA et al., 2014; ARGENTA et al., 2008), 8 a 32 µg/mL para a anfotericina B; (CAVALHEIRO et al., 2009a), 8 a 64 µg/mL para caspofungina (PEREIRA et al., 2007) e 256 µg/mL para a micafungina (ZANETTE et al., 2014). Essas diferenças podem ser devido a diferentes técnicas utilizadas, microdiluição e macrodiluição em caldo (ARGENTA et al., 2008;

CAVALHEIRO et al., 2009<sup>a</sup>; PEREIRA et al., 2007; FONSECA et al., 2014) ou ao número de isolados (ZANETTE et al., 2014) deste estudo (n=30) ser maior e portanto mais representativo, pois Loreto et al. (2014) também obteve com 27 isolados de *P. insidiosum* CIMs acima das observadas na literatura sendo a variação de 4 a 64. µg/mL para a terbinafina; 4 a 64 para o itraconazol; 16 a >32 para caspofungina e > de 32 µg/mL para voriconazol, anfotericina B e itraconazol (Tabela 1)

No estudo com antibacterianos não houve diferenças discrepantes das CIMs deste trabalho, quanto às encontradas na literatura. As CIMs variaram de 0,125 a 8 µg/mL para a azitromicina; 0,25 a 8 para a claritromicina; 0,25 a 4 para a minociclina e tigeciclina. Loreto et al. (2011), ao estudarem antibacterianos macrolídeos e tetraciclina obtiveram CIMs entre 2 a 32 µg/mL para a azitromicina; 0,5 a 8 µg/mL para a claritromicina e 0,125 a 2 para a minociclina. Mahl et al. (2012) obtiveram CIMs entre 0,25 a 2 µg/mL para tigeciclina. Um estudo mais recente realizado por Loreto et al. (2014) com diferentes métodos de avaliação da susceptibilidade como disco difusão, microdiluição em caldo e E-test reportam variações na CIMs de 1 a 8 µg/mL para a azitromicina; 0,25 a 8 µg/mL para a claritromicina; 0,125 a 4 µg/mL para a minociclina e 0,25 a 4 para a tigeciclina. As variações nos percentuais de sinergismo (JESUS et al., 2014) foram de 46,67 a 73,33% para minociclina, 33,33 a 66,67 para tigeciclina, 43,33 a 73,33% para claritromicina seguido de azitromicina 33,33% a 53,33%. Foi observado antagonismo com na associação de antibacterianos com as equinocandinas (6,67 a 3,33%) e itraconazol (6,67%) (Tabela 1).

O pequeno número de antifúngicos disponíveis aliado a casos de insucesso terapêutico tem despertado a busca por novos compostos com ação anti-*Pythium* (LORETO et al., 2012; KRAJAEJUN et al., 2012; SRIPHANA et al., 2013; SUTHIWONG et al., 2014; MAISSA; WALID, 2014; FONSECA et al., 2014). Nesta perspectiva o segundo objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de carvacrol e timol associado a antibacterianos e antifúngicos frente isolados de *P. insidiosum* (JESUS et al., 2014b).

A escolha de carvacrol e timol deve-se a estes dois compostos fenólicos estarem presentes como frações majoritárias na maioria dos óleos essenciais com atividade anti-*Pythium* (MAISSA; WALID, 2014; FONSECA et al., 2014). Neste trabalho a concentração mínima de composto fenólico para inibir o crescimento de 100% dos isolados de *P. insidiosum* variaram de 160 a 320 µg/mL para o timol e para o carvacrol

de 80 a 320 µg/mL. Maissa e Walid (2014) avaliaram a ação anti-*Pythium* de carvacrol e timol frente isolados do gênero *Pythium*. As concentrações de timol para inibir 50% do micélio foram 263 µl/L para *P. ultimum* e 400, 26 µl/L, atividade de carvacrol não foi relatada. Fonseca et al. (2014), avaliaram a atividade antifúngica de *Origanum vulgare*, *O. majorana*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* frente isolados de *P. insidiosum*, sendo que as menores CIMs foram obtidas com o óleo de *O. majorana* que possui em sua composição mais de 90% de carvacrol, comprovando a sensibilidade do gênero *Pythium* a estes compostos.

Acredita-se que pelo mecanismo de ação antifúngica destes compostos estudados por RAO et al. (2010), como alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática e parede celular, corrobora com a possibilidade de ocorrer sinergismo com antifúngicos de parede como azólicos, derivados poliênicos e equinocandinas que irão agir na membrana citoplasmática. Da mesma forma acredita-se em interações sinérgicas destes derivados fenólicos a tetraciclina e macrolídeos, por não disputarem o mesmo sítio de ação, mas ambos serem complementares. As tetraciclina agem inibindo a síntese proteica, processo essencial para a sobrevivência da célula; timol e carvacrol vão agir a nível de membrana causando desequilíbrio osmótico e morte celular.

A associação *in vitro* de timol e carvacrol com antifúngicos e antibacterianos não revelaram nenhuma interação antagônica, sendo que os maiores percentuais de sinergismo com antifúngico foi alcançado com itraconazol (96%), e os menores com carvacrol e terbinafina (32%) e timol com caspofungina (36%). Com antibacterianos o melhor percentual foi timol com claritromicina (92%) e o menor timol com tigeciclina (60%). Estudos futuros devem ser realizados com estes compostos, pois o maior desafio a partir da descoberta da atividade antifúngica é a extrapolação para o tratamento *in vivo*, definindo a toxicidade, via de administração e posologia destes compostos, pois a pitiose é uma doença grave de caráter crônico que normalmente exige tratamentos prolongados para alcançar cura clínica.

A avaliação da susceptibilidade *in vitro* de antibacterianos associados contra *P. insidiosum*, revelou um importante caráter inibitório do crescimento de zoósporos (livres, encistados e formando hifas jovens) considerado os propágulos necessários para a transmissão da doença. Fundamentado nesses dados o objetivo do **Artigo 3** foi avaliar a eficácia *in vivo* e *in vitro* de antibacterianos em monoterapia e associações. A combinação *in vitro* com antibacterianos foi realizada compondo os seguintes grupos: minociclina com azitromicina (93,33%), claritromicina (93,33%) e tigeciclina (86,67%);

tigeciclina com azitromicina (66,67%) e claritromicina (60,00%) e azitromicina com claritromicina (70,00%). Todas as associações *in vitro* geraram bons percentuais de sinergismo, no entanto nas associações com minociclina foram maiores, por esse motivo foram utilizados esses grupos para os testes *in vivo*. No experimento *in vivo* todos os grupos diferiram do grupo controle positivo ( $P < 0,05$ ). A cura clínica foi alcançada nos grupos minociclina (n=1/6), azitromicina (n=5/6), minociclina com azitromicina (n=4/6), minociclina com claritromicina (n=1/6) e minociclina com tigeciclina (n=1/6).

A evidência de um alto percentual de sinergismo de minociclina com claritromicina (93,33%) e o baixo índice de cura (16,66%), alerta para um cuidado na correlação de testes de susceptibilidade *in vitro* e sua transposição para o tratamento *in vivo*. Em ensaios clínicos, outros fatores farmacológicos devem ser considerados. Por exemplo, azitromicina, enquanto produz baixas concentrações no soro (0,4 µg/mL) nos tecidos podem variar de 10 µg/mL a 100 µg/mL (CHAMBERS e DECK, 2009), corroboram com os dados obtidos nesse estudo onde a média geométrica (MG: 1,91 µg/mL) foi a maior quando comparada aos demais antibacterianos testados claritromicina (MG: 1,38 µg/mL), minociclina (MG: 0,91 µg/mL) e tigeciclina (MG: 0,71 µg/mL). E nos experimentos *in vivo* obteve o melhor índice de cura (83,33%) na monoterapia, a associação de minociclina e azitromicina (66,66%), foi o segundo grupo mais efetivo em evitar a disseminação e lesão causada por *P. insidiosum*. Apesar de tigeciclina apresentar um animal curado, não foi capaz de conter a metástase pulmonar em um dos coelhos. A capacidade de conter a infecção dos antibacterianos foi realizada pela medida das lesões, sorologia pela técnica de ELISA e após eutanásia, cultivo, isolamento, PCR e análise histopatológica dos tecidos coletados.

Coleta de sangue e soro foram realizadas antes, durante e após o tratamento. As coletas antes do tratamento foram utilizadas apenas para controle hematológico do animal saudável e do animal com pitiose antes de iniciar o tratamento. O perfil bioquímico reforça o uso seguro de antibacterianos no tratamento de coelhos com pitiose experimental, não havendo alterações hepáticas e renais, significativas detectadas pelas enzimas ALT, AST, uréia e creatinina. O hemograma de coelhos com pitiose demonstraram inicialmente leucocitose que ao longo do tratamento com antibacterianos diminui e até mesmo retornam a normalidade conforme a eficiência do medicamento.

A coloração hematoxilina-eosina, revelou áreas de necrose contendo o agente, que se apresentou como imagem negativa, circundadas por infiltrado de macrófagos,

linfócitos e neutrófilos degenerados associados à proliferação de tecido conjuntivo fibroso e presença de célula gigante. Para visualização da hifa foi realizado a coloração de Grocott e para sua quantificação no tecido foi utilizado um sistema de cruzes onde a discreta quantidade de hifas, foi definida como intensidade + e grande quantidade de hifas classificada como intensidade +++++. As características das lesões foram semelhantes as descritas em outros experimentos com coelhos experimentalmente infectados com pitiose (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2012; BOTTON et al., 2011; LORETO et al., 2012; ZANETTE et al., 2013b; ZANETTE et al., 2014).

A eficácia dos tratamentos *in vivo* foi comprovada por baixa quantidade de hifas nos tecidos, ausência de crescimento no cultivo, negatividade no PCR dos tecidos, retorno do hematócrito a normalidade ou próximo à normalidade durante o tratamento (Tabela 2).



**Tabela1. Comparação da susceptibilidade de 30 isolados de *Pythium insidiosum* frente antifúngicos e antimicrobianos com dados obtidos na literatura.**

Fármacos	Resultados		Literatura		Referência
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	MG ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	MG ( $\mu\text{g/mL}$ )	
<b>Antifúngicos</b>					
Anfotericina-B	8 – 128	34,3	8 – 32	25,06	LORETO et al., 2014
Anidulafungina	512 –> 512	1.000,61	-	-	-
Caspofunfina	32 – 256	94,79	16 –>32	47,5	PEREIRA et al., 2007
Itraconazol	256 –> 512	0,79	32 – 64	-	CAVALHEIRO et al., 2009a
Micafungina	32 – 128	64	16 – 32	18,5	ZANETTE et al., 2014
Voriconazol	256 –> 512	871,08	16 – 64	-	LORETO et al., 2014
<b>Antibióticos</b>					
Azitromicina	0,125 – 8	1,91	2 – 32	4,57	LORETO et al., 2014
Claritromicina	0,25 – 8	1,38	0,5 – 8	1,53	LORETO et al., 2014
Minociclina	0,25 – 4	0,91	0,125 – 2	0,39	LORETO et al., 2012
Tigeciclina	0,25 – 4	0,79	0,25 – 2	0,9	MAHL et al., 2012

CIM: concentração inibitória mínima; MG: média geométrica

**Tabela2: Característica hematológicas e bioquímicas de coelhos com diminuição das lesões causadas por *Pythium insidiosum* tratados com azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeiclina em monoterapia e terapia combinada.**

nd: não detectado.

Tratamento	Hemograma						Bioquímico						Detecção de hifa		
	RBC	HGB	WBC	HET	EOS	LIN	MON	AST	ALT	URE	CRE	Grocott	PCR	Cultura	
<b>Minociclina</b>	5.17±0.84	11.77±2.19	18,529±14,740	11,327±12,645	333±360	6,202±1,524	666±798	29±23	24±13	30±4	1.4±0.3				
<i>Coelho 25</i>	5.54	12.50	8,100	3,240	81	4,455	324	22	25	35	1.37	-	-	-	
<b>Azitromicina</b>	6.56±2.39	13.24±4.85	12,957±9,174	5,316±6,030	441±651	4,704±2,288	368±267	25±9	24±11	39±9	1.3±0.5				
<i>Coelho 05</i>	5.69	12.30	8,000	3,120	0	4,720	160	25	22	40	1.1	-	-	-	
<i>Coelho 21</i>	6.40	13.20	7,100	3,124	213	3,479	284	30	38	35	1.2	-	-	-	
<i>Coelho 26</i>	6.64	14.10	8,600	3,526	172	4,644	258	27	24	32	0.9	-	-	-	
<i>Coelho 27</i>	7.65	15.40	8,600	2,322	430	4,988	860	20		<b>54</b>	<b>2.4</b>	-	-	-	
<i>Coelho 29</i>	6.90	13.30	4,800	2,592	96	1,872	240	25	16	36	1.1	-	-	-	
<b>Claritromicina</b>	6.52±0.43	13.16±1.28	26,514±11,034	16,871±8,996	1,053±797	6,241±2,041	2,349±2,203	37±22	24±13	29±8	1.0±0.1				
<i>Coelho 20</i>	6.74	14.50	11,700	3,042	117	8,424	117	83	53	38	1.1	-	-	-	
<b>Tigeiclina</b>	5.64±0.49	12.24±1.15	19,240±13,033	12,085±11,179	1,002±905	5,250±1,815	902±622	29±30	18±4	31±6	1.5±0.4				
<i>Coelho 15*</i>	5.56	13.20	12,100	5,566	121	5,929	484	13	12	24	1.0	-	-	-	
<b>Minociclina+azitromicina</b>	6.80±0.80	13.69±1.49	11,986±7,827	6,592±6,368	256±176	4,294±898	844±770	25±5	21±9	40±19	1.1±0.4				
<i>Coelho 02</i>	6.25	6.52	4,900	1,568	0	2,646	686	33	11	<b>79</b>	<b>4.7</b>	-	-	-	
<i>Coelho 18</i>	7.44	7.44	13,200	8,184	132	4,356	528	22	18	37	1.5	-	-	-	
<i>Coelho 30</i>	6.64	6.64	7,800	2,886	390	4,212	312	31	36	33	1.0	-	-	-	
<i>Coelho 31</i>	6.40	6.40	7,100	2,485	284	4,189	142	27	31	36	1.1	-	-	-	
<b>Minociclina+claritromicina</b>	5.23±0.88	11.55±1.78	21,613±17,276	14,744±12,175	1,003±1,427	2,995±1,246	1,496±1,054	25±18	18±10	36±13	1.5±0.6				
<i>Coelho 20</i>	4.46	10.40	4,300	731	129	3,268	172	21	12	31	1.7	-	-	-	
<b>Minociclina+tigeiclina</b>	5.32±0.95	10.90±2.48	13,200±9,390	7,698±7,186	350±598	4,000±2,256	1,152±1,383	41±43	27±18	45±16	1.8±0.3	+			
<i>Coelho 39</i>	6.18	13	4,800	2,496	0	2,208	96	27	25	40	1.72	-	-	-	
<i>Coelho 07</i>	5.81	12.6	10,000	2,800	100	7,000	100	22	25	48	2.43	-	-	-	
<b>Controle doença</b>	5.32±0.58	11.63±1.61	20,150±8,206	8,801±9,178	393±409	7,438±5,267	2,100±3,722	31±20	22±17	32±7	1.3±0.2	+ à +++++		+	
<b>Controle negativo</b>	6.07±0.60	13.90±1.35	10,550±2,384	3,121±1,178	243±106	6,112±2,768	404±170	27±14	29±10	41±4	1.6±0.4	nd	nd	nd	

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados desses estudos, pode-se concluir que:

- As altas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antifúngicos azólicos, alilaminas, poliênicos e as concentrações efetivas mínimas (CEMs) das equinocandinas reforçam que *P. insidiosum* é pouco susceptível a esses fármacos. A marcada sensibilidade de antibacterianos com CIMs relativamente baixas, quando associados aos antifúngicos revelaram marcada diminuição das CIFs quando comparada as CIMs, mostrando uma tendência a interações sinérgicas entre esses fármacos.
- Azitromicina apresentou o maior número de associações antagônicas quando combinada a antifúngicos, embora que em baixo percentual (terbinafina, anotericina B, itraconazol, caspofungina e anidulafungina; 3,33%), seguida de claritromicina (caspofungina e anidulafungina; 3,33%; itraconazol; 6,67%); minociclina (caspofungina; 6,67%) e tigeciclina (anidulafungina; 3,33%).
- O mecanismo de ação de timol e carvacrol semelhante aos antifúngicos azólicos e antibacterianos, reforçam o sinergismo comprovado com marcada diminuição das concentrações inibitórias fracionárias (CIFs) em comparação as concentrações inibitórias mínimas (CIMs).
- Os testes *in vitro* com associação de antibacterianos, instigaram a extensão destes resultados para testes *in vivo* em coelhos com pitiose experimental, apesar da associação de Minociclina com azitromicina ou claritromicina apresentarem sinergismo acentuado *in vitro*, a claritromicina teve baixo percentual de cura clínica (16,66%).

Azitromicina foi mais eficaz no combate da pitiose *in vivo* (83,33%) e associada à minociclina (66,66%). Revelando a necessidade de um cuidado maior na correlação de dados *in vitro* para *in vivo*.

- As interações de antibacterianos e antifúngicos revelaram percentuais de sinergismo relativamente baixos quando comparado à associação de antibacterianos com antibacterianos. A associação de timol e carvacrol apresentaram percentuais de sinergismo com antibacterianos e antifúngicos superiores ao de ambos associados. Apenas as associações de antibacterianos com equinocandinas e itraconazol revelaram a presença de antagonismo.
- Todos os grupos de fármacos associados *in vivo* foram sinérgicos quando comparados ao grupo controle da pitiose, exceto azitromicina que em monoterapia (5/6) alcançou índices de cura superior a associação (4/6).
- O teste sorológico realizado durante o tratamento e análise histopatológica, PCR e cultivo dos tecidos coletados revelaram que tigeciclina não foi capaz de evitar a metástase pulmonar (1/6). A cura da pitiose foi comprovada com a negatividade pelas técnicas de detecção de *P. insidiosum* em tecidos e marcada redução nos níveis de anticorpos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 24, n. 2, p. 51-56, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0075072.
- ADHIKARI, B. N. et al. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. **PLOS One**. v. 8, n. 10, p. e75072, 2013.
- AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 30, p. 41-50, 2011. doi: 10.1007/s10096-010-1050-8.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 48, n. -, p. 80-86, 2013.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Pythium* Oomycete. In: **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons. p. 683-737, 1996.
- ÁLVAREZ, J. C.; GARCÍA, L. R.; GARAY, O. V. Pythiosis cutânea equina em Córdoba, Colombia. Reporte de cinco casos. **Revista científica, FCV-LUZ**. v. XX, p. 590-594, 2010.
- ÁLVAREZ, J. A. C.; VILORIA, M. I. V.; AYOLA, S. C. P. Evaluación clínica e histopatológica de la pitiosis cutánea en burros (*Equus asinus*). **Revista de Medicina Veterinária**. p. 9-19, 2013.
- ALVES, S. H. et al. Aplicação do “ELISA-conta” no diagnóstico da pitiose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, n. 3, p. 155-157, 2001.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Current Drug Targets**. v. 13, n. 6, p. 842-862, 2013.
- ARGENTA, J. S. et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 2, 767-769, 2008.
- \_\_\_\_\_. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 137-142, 2012.
- AUSTWICK, P. K. C. & COPLAND, J. W. Swamp cancer. **Nature**, London, v.250, n. 461, p.84, 1974.

AZEVEDO, M. I. et al. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Veterinary Microbiology**. v. 159, n.1-2, p. 141-148, 2012.

BACH, B. C. et al. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 718-722, 2010.

\_\_\_\_\_. E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. **Cell Biochemistry and Function**, v.31, p. 476-481, 2013.

BALTCH, A.L., et al. Effects of voriconazole, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon  $\gamma$  on intracellular fluconazole-resistant *Candida glabrata* and *Candida krusei* in human monocyte-derived macrophages. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 52, p. 299-304, 2005.

BEGGS, W. H.; SAROSI, G.A.; WALKER, M.I. Synergistic action of amphotericin B and rifampin against *Candida* species. **Journal of Infection Diseases**. v.133, p.206-209, 1976. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 17, n. 4, p. 402-404, 1986.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of Synergistic interactions between Amphotericin-B and Flucytosine.

BELLOCCHIO, S. et al. The Contribution of the Toll-Like/IL-1 Receptor Superfamily to Innate and Adaptive Immunity to Fungal Pathogens *In Vivo*. **The Journal of Immunology**. v. 172, n. 1, p. 3059-3069, 2004.

BEN-AMI, R. et al. Antifungal activity of colistin against *Mucorales* species *in vitro* and in a murine model of *Rhizopus oryzae* pulmonary infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 484-490, 2010.

BENTINCK-SMITH, J. et al. Canine pythiosis - isolation and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, n. 4, p. 295-8, 1989.

BIANCHI, M. V. **Dermatopatias diagnosticadas em equinos no setor de patologia veterinária da UFRGS de 2000 a 2013**. 2013. 24f. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BISH, D. et al. Terpenoid composition and antifungal activity of three commercially important essential oils against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. **Natural Product Research**. v. 25, n. 20, p. 1993-1998, 2011.

BISSONNETTE, K. W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 29, n. 1, p. 39-44, 1991.

BOABAID, F. M. et al. Conidiobolomycose em ovinos no estado de Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n.1, p. 77-81, 2008.

BOSCO, S de. M. et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.

\_\_\_\_\_. Morphological and molecular characterization of na equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparasion with the first human isolate from the same geographic region. **Medical Mycology**. v. 46, n. 6, p. 557-565, 2008.

BRIDGES, C. H. & EMMONS, C. W. A phycomycosis of horses caused by *homyces destruens*. **Journal of the American l'eterinao, Medical Association**, v.13, 579-589, 1961.

BOTTON, S. A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1225-1229, 2011.

CALVANO, T.P. et. Al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of clinical Microbiology**. v. 49, n.10, p.3710-3713, 2011.

CAMELE, I. et al. *In vitro* Control of Post-Harvest Fruit Rot Fungi by Some Plant Essential Oil Components. **Internationl Journal of Molecular Sciences**. v. 13, p. 2290-2300, 2012.

CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 567-571, 2004.

CARMO, P. M. S. et al. Cutaneous Pythiosis in a Goat. **Infectious Disease**. v.-, p. 1-3, 2014.

CARNES, D. W.; LEARY, J. V. (1977). The sensitivity of *Phytophthora palmivora* to chloramphenicol. **Proceedings of the American Phytopathological Society**. v.4,n. 6, p. 94-9, 1977.

CARRERA, M. V. et al. Pitiose em ovinos nos estados de Pernanbuco e Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 4, p. 476-482, 2013.

CARVALHO, E. C. Q.; LEMOS, L. S.; REIS Jr., J. L. **Pitiose equine o popular formigueiro da Baixada Campista**. Boletim Técnico UENF. 2000. 48p.

CAVALHEIRO, A. S. et al. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2136-2138, 2009a.

\_\_\_\_\_. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B,fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 408-411, 2009b.

CENCI, E. et al. Induction of Protective Th1 Responses to *Candida albicans* by Therapy Alone or in Combination with an Interleukin-4 Antagonist Antifungal. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 176, n. 1, p. 217-226, 1997.

CHAMI, N. et al. Antifungal Treatment With Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 8, n. 3, p. 217-226, 2004.

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 2, p. 310-312, 1992.

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W. C. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America-Equine Practice**, v. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.

CHAMBERS, H.F., and DECK D. H. Tetracyclines, macrolídes, clindamycin, chloranphenicol, streptogramins and oxazolines, **Basic nad Clinical pharmacology**. New York, USA, p. 795-806, 11 ed, 2009.

CHAREONSIRISUTHIGUL,, T. et al., Performance comparasion of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. **Diagnostic Microbiology and infectious Diseases**. v. 76, n.1, p. 42-45, 2013.

CHILLER, T. et al. The interaction of human monocytes, monocyte-derived macrophages, and polymorphonuclear neutrophils with caspofungin (MK-0991), an echinocandin, for antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 39, n. 2, p. 99-103, 2001.

CLANCY, C.J. et al. Inhibition of RNA Synthesis as a Therapeutic Strategy against *Aspergillus* and *Fusarium*: Demonstration of *In vitro* synergy between Rifabutin and Amphotericin B **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.42, p. 509–513, 1998.

CLEARY, J. D.; CHAPMAN, S. W. and NOLAN, R. L. Pharmacologic Modulation of Interleukin-1 Expression by Amphotericin B-Stimulated Human Mononuclear Cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 36, n. 5, p. 977-981, 1992.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE (CLSI), 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, second edition. CLSI Document M38-A2 [ISBN 1-56238-668-9]. **Clinical and Laboratory Standarts Institute**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania19087-1898, USA.

DALLEAU, S. et al. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 31, p. 572-576, 2008.

DAVIS, D. J. et al. Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* espécies and pathogenicity toward plant and animal hosts. **Mycological Research**. v. 110, n. Pt1, p. 96-103, 2006.



DE COCK, A. W. A. M.; MENDOZA, L.; PADHYE, A.; AJELLO, L.; KAUFMAN L. *Pythium insidiosum* SP. Nov. the etiologic agent pythiosis. **Journal of clinical Microbiology**. v.25, n.2, p. 344-349, 1987.

DE HAAN, J.; HOOGKAMER, L.J. *Hyphomycosis destruens*. **Veeartsennijkundige Bladen voor Nederlandsch-Indie**. v. 13,n. 2, p. 350-374, 1901.

DE VRIES H. AGSTERIBBE E.; KROON A. M. The 'fragment reaction': a tool for the discrimination between cytoplasmic and mitochondrial ribosomes. **Biochimica et biophysica acta**, v.246, n.1, p.111-122, 1971.

DICK, M. W. **Straminipilous fungi**: Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protist, the plasmodiophorids and similar organisms. London: Kluwer Academic Publishers, 2001, p.67.

DYKSTRA, M. J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**, v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.

DYKSTRA, C. C. et al. Selective inhibition of topoisomerases from *Pneumocystis carinii* compared with that of topoisomerases from mammalian cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.38, p.1890-1898, 1994.

DREW R.H. Polyenes for prevention and treatment of invasive fungal infections. **Antifungal Therapy**, 1a ed. New York, USA. 2010, cap. 10, p.163-183.

DÓRIA, R. G. S. et al. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of amphotericin B. **Veterinary Surgery**, v. 41, p. 759-765, 2012.

ELIOTT, C. G. Sterols in fungi: Their functions in growth and reproduction. **Advanced Microbiology Physiology**. v.15, p. 121-173, 1977.

ELSEA, S. H.; OSHEROFF, N.; NITISS, J.L.N. Cytotoxicity of quinolones toward eukaryotic cells. Identification of topoisomerase II as the primary cellular target for the quinolone CP-115,953 in yeast. **Journal of biological chemistry** . v. 26, n. 7, p. 13150-13153, 1982.

EDWARDS, J. E. et al. Combined effect of amphotericin B and rifampin on *Candida* species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.17, p.484-487, 1980.

FERNANDES, C. P. M. et al. Gastric pythiosis in a dog. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 4, p. 235-237, 2012.

FISCHER, J. R. et al. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 3, p. 380-382, 1994.

FOIL, C. S. Update on pythiosis (Oomycosis). The North American Veterinary Conference, 1996. Orlando. Bayer Animal Health. p.57-63.

- FOSTEL, J.; MONTGOMERY, D.; LARTEY, P. Comparison of responses of DNA topoisomerase I from *Candida albicans* and human cells to four new agents which stimulate topoisomerase-dependent DNA nicking. **FEMS Microbiology Letter**. v. 138, p.105–111, 1996.
- FONSECA, A.O. et al. *In vitro* Susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* Isolates to Essential Oils of Some Lamiaceae Family Species. **Mycopathologia**. v. 179, n. 3-4, p. 253-258, 2014.
- FRANCO, D. M. et al. Systemic *Pythium insidiosum* in a pediatric burn patient. **Burns**, v. 36, n. 5, p. 68-71, 2010.
- FREY JR, F. et al. Pitiose equina na região sul do Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p. 561–562, 2007.
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n(1-2), p.1- 16, 2010.
- GABRIEL, A. L. et al. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 12, p. 583-587, 2008.
- GALLUCCI, M. N. et al. *In vitro* activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure–activity relationship analysis. **Journal of Applied Microbiology**. v. 116, p. 795-804, 2014.
- GELLERT, M. et al. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. **Proceedings of National Academic Science**. v. 74, p. 4772–4776, 1977.
- GOZALBES, R. et al. Anti-Toxoplasma Activities of 24 Quinolones and Fluoroquinolones *In vitro*: Prediction of Activity by Molecular Topology and Virtual Computational Techniques. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 10, p. 2771-2776, 2000.
- GRECCO, F.B. et al. Cutaneous pythiosis in cattle in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 938-942, 2009.
- GRIVELL, L.A. Amino acid incorporation by mitochondria isolated, essentially free of microorganisms, from *Saccharomyces carlsbergensis*. **Biochemical Journal**. v.105, n. 3, p. p. C44-&, 1967.
- GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 2, p. 147-152, 2002.
- GROOTERS, A. M. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked Immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 2, p. 142-146, 2002 a.

GROOTERS, A. M. et al. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 4, p. 288-294, 2002 b.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**. v. 146, p. 144-150, 2011.

HAHTAPORNSAWAN, S. et al. Suprainguinal Vascular Pythiosis: Effective Long-term Outcome of Aggressive Surgical Eradication – A Case Report and Literature Review. **Annals of Vascular Surgery**. 2014. doi: 10.1016/j.avsg.2014.04.020.

HARTFIELD, J. N.; GROOTERS A. M.; WAITE, K. J. Development and evaluation of an ELISA for the quantitation of anti-Lagenidium giganteum forma caninum antibodies in dogs. **J Vet Intern Med**. v. 18, p. 1479-1484. 2014.

HAZEM, S. E. et al. Antifungal Activity of Some Constituents of Origanum vulgare L. Essential Oil Against Postharvest Disease of Peach Fruit. **Journal of Medicinal Food**. v. 00, n.0, p. 1-6, 2015. doi: 10.1089/jmf.2014.0167.

HENDRIX, J.W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**, v. 144, 1964.

HENDRIX. ,J.W. Physiology and biochemistry of growth and reproduction in *Pythium*. **Proceedings of the American Phytopathological Society**. v. 22, p.743-752, 1974.

HENSEL, P. et al. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 2, p. 215-218, 2003.

HOFFMAN, M. A.; CORNISH, N. E.; SIMONSEN, K. A. A painful thigh lesion in an immunocompromised 11-year-old Boy. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 11, p. 1017-1018, 2011.

HOMEYER, D. C. et al. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on filamentous fungi and toxicity to human cells. **Medical Mycology**. v. 00, n. 0, p. 1-10, 2015.

HOWERTH, E. W.; BROWN, C. C.; CROWDER, C. Subcutaneous pythiosis in a dog. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 1, n. 1, p. 81-3, 1989.

HUGHES, C. E. et al. *In vitro* activities of amphotericin B in combination with four antifungal agents and rifampin against *Aspergillus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.25, p.560-562, 1984.

HUPPERT, M.; SUN, S. H.; VUKOVICH, K.R. Combined amphotericin B-tetracycline therapy for experimental coccidioidomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 5, p. 473-478, 1974.

IBRAHIM, A. S. et al. Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron chelation, polyenes, and echinocandins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 4, 1768-1770, 2011.

ICHTANI, T.; ANEMIYA, J. *Pythium gracile* isolate from the foci of granular dermatitis in the horse (*Equus caballus*). **Transactions of Mycology Society of Japan**. v. 21, p.263-265, 1980.

IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**. v. 70, p.558–560, 1994a

\_\_\_\_\_. Systemic fungal infections in Thailand. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, n. 5, p. 395-399, 1994b.

\_\_\_\_\_. Mycotic keratitis in Thailand. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, n. 1, p. 81-82, 1995.

JESUS, F.P.K. et al. *In vitro* Synergism Observed with Azithromycin, Clarithromycin, Minocycline, or Tigecycline in Association with Antifungal Agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58, n. 9, p. 5621-5625, 2014a.

\_\_\_\_\_. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **J Mycol Med**. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.10.023, 2014b.

JIAN, R.H.Y.; TYLER, B.M. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**. v. 50, p. 295-318, 2012.

JOHNSON, M.D., MOHR, J. Echinocandins for prevention and treatment of invasive fungal infection. **Antifungal therapy**. New York, USA, 2010, cap. 13, p. 219-242.

KOBAYASHI, G.S. et al. Amphotericin B potentiation of rifampin as an antifungal agent against the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. **Science**. v.177, p.709-710, 1972.

KOSRIRUKVONGS, P. et al. Evaluation of nested pcr technique for detection of *Pythium insidiosum* in pathological specimens from patients with suspected fungal keratitis. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. v. 45, n.1, p. 167-173, 2014.

KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 569-576, 2006.

KRAJAEJUN, T. et al. *In vitro* antimicrobial activity of volatile organic compounds from muscodor crispans against the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. v. 43, n.6, p. 1474-1483, 2012.

- KRAJAEJUN, T. et al. Infectious Diseases and Tropical Disease Pathology: SY16-3 Pythiosis: an endemic fatal infectious disease. **Pathology**. 2014. doi: 10.1097/01.PAT.0000454146.02028.39. 2014 a.
- KRAJAEJUN, T. et al. Transcriptome analysis reveals pathogenicity and evolutionary history of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Fungal Biology**. v. 118, n. 7, p. 640-653, 2014 b.
- KWONCHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, p. S1-S7, 1994.
- LAMB A.J.; CLARK-WALKER G.D.; LINNANE, A. W. The biogenesis of mitochondria 4: the differentiation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems *in vitro* by antibiotics. **Biochimica et biophysica acta**. v. 161, n. 2, p. 415-427, 1968.
- LAMPEN, J. O. Interference by polyenic antifungal antibiotics (especially nystatin and filipin) with specific membrane functions. **Symposium of the Society of General Microbiology**. v. 16, p. 111-130, 1966.
- LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. **Vascular**, v. 17, n. 4, p. 234-238, 2009.
- LASS-FLORL, C.; MAYR, A. Human protothecosis. **Clinical Microbiology**, v.20, p.230–242, 2007.
- LEW, M. A.; BECKETT, K. M.; LEVIN, M. S. Antifungal activity of four tetracycline analogues *in vitro*: potentiation by amphotericin B. **Journal of Infectial Disease**. v. 136, p. 263-270, 1977.
- LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Rationale for Combination Antifungal Therapy. **Pharmacotherapy**. v. 21, n. 8, p. 149-164s. 2001.
- LILJEBJELKE, K. A. et al. Duodenal obstruction caused by infection with *Pythium insidiosum* in a 12-week-old puppy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 8, p. 1188-1191, 2002.
- LEAL, A. B. M. et al. Equine pythiosis in the Brazilian Pantanal region: Clinical and pathological findings of typical and atypical cases. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 151-156, 2001.
- LEARY, J.V. et al. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* isolates in response to antibiotics. **Phytopathology**. v. 72, p. 750-754, 1982.
- LÉVESQUE, C. A.; DE COCK, A.W.A.M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**. v. 108, n.12, p. 1363-1383, 2004.

LEW, M. A.; BECKETT, K. M.; LEVIN, M. S. Antifungal activity of four tetracycline analogues *in vitro*: potentiation by amphotericin B. **Journal of Infectious Disease**. v. 136, p.263-270, 1977.

LIN, Q. H.; KATAKURA, K.; SUZUKI, M. Inhibition of mitochondrial and plastid activity of *Plasmodium falciparum* by minocycline. **FEBS Letters**, v. 515, p. 71–74, 2002.

LORETO, E.S. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3588-3590, 2011.

\_\_\_\_\_. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 156, 222-226, 2012.

\_\_\_\_\_. New Insights into the *in vitro* Susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.58, n. 12, p. 7534–7537, 2014.

MACDONALD, E. et al. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology**, v. 37, n. 3, p. 245-249, 2002.

MAHL, D.L. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, 4021-4023, 2012.

MAISSA, B.J.; WALID, H. Antifungal activity of chemically different essential oils from wild Tunisian *Thymus* spp. **Natural Product Research**. v. 29, n.9, p. 869-873, 2015.

MANOHAR, V. et al. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 228, p. 111-117, 2001.

MARCHANT, R.; SMITH, D.G. The effect of chloramphenicol on growth and mitochondrial structure of *Pythium ultimum*. **Journal of General Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 391-397, 1968.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, 865-868, 2012.

MARTINS, T. B. et al. A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. **Journal of comparative Pathology**. v. 146, n. 2-3, p. 122-131, 2012.

MEIRELES, M. C. A. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**, v. 36, n. 3-4, p. 139-142, 1993.

MEDOFF, G. M. et al. Potentiation of rifampin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B. **Proceedings of National Academic Science**, v.69, p.196-199, 1972.

- MEDOFF, G. M. et al. Antifungal agents in therapy of systemic fungal infections. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.23, p. 303-330,1974
- MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa-Rica report of 39 cases. **Mycopathologia**, v. 94, n. 2, p. 123-129, 1986.
- MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2967-2973, 1993.
- MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal De Mycologie Medicale**, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.
- MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2797-2804, 2003.
- MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; F.; AJELLO. L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**. v. 47, n. 1-2, p. 14-23, 2004.
- MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*. In: MERZ, W. G.; HAY, R. J. (Ed.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. 10. ed. London: ASM Press, 2005. p. 617-630.
- MENDOZA, L.; NEWTON, J. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**. v. 43, n.6, p. 477-486, 2005.
- MENDOZA, L.; VILELA, R. What is your diagnosis? *Pythium insidiosum* or *Lagenidium* sp.? **Veterinary Clinical Pathology**. v. 38, n. 3, p. 273, 2009.
- MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**. v. 7, n.3, p. 198-208, 2013.
- MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 8, p. 377-382, 1981.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 221-226, 1982.
- \_\_\_\_\_. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 21, n. 4, p. 331-341, 1983a.
- \_\_\_\_\_. Hematology of horses with phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 1, p. 28-29, 1983b.
- MILLER, R. I.; OLCOTT, B. M.; ARCHER, M. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 9, p. 984-986, 1985.

MONTEIRO, A. B. **Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum***. 1999. 52 f (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

MOSBAH, E. et al. Diagnosis and surgical management of pythiosis in draft horses: report of 33 cases in Egypt. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 3, p. 164-169, 2012.

MOORE-LANDECKER, J. Fundamentals of the Fungi. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, Inc. Cap. 3: **Zoosporic fungi**, p. 33-79, 1996.

MUGNAINI, L. et al. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. **Mycoses**. 2013. doi: doi:10.1111/myc.12034.

NETO, R. T. et al. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 2, p. 202-204, 2010.

NGUYEN, M. H. et al. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by azithromycin against *Aspergillus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 16, p. 846–848, 1997.

OLDENHOFF, W. et al. Cutaneous pythiosis in two dogs from Wisconsin, USA. **Veterinary Dermatology**. v. 25, p. 52-54 e20. 2014. In press. doi: 10.1111/vde.12101.  
ORCI, L. et al. Opposite polarity of filipin-inducer deformations in the membrane of condensing vacuoles and zymogen granulates. **Science**, v. 210, p. 1019-1021, 1980.

PAN, J. H. A complicated case of vascular *Pythium insidiosum* infection treated with limb-sparing surgery. **International Journal of Surgery Case Reports**. n. 5, p. 677-680, 2014.

PESAVENTO, P. A. et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 538-541, 2008.

PEREIRA, D.I.B. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1168-1171, 2007.

\_\_\_\_\_. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, n. 3, p. 129-133, 2008.

\_\_\_\_\_. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. **Vet Res Commun**. v. 34, p. 301-306, 2010, in press. doi: 10.1007/s11259-010-9354-9.

\_\_\_\_\_. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**. v. 176, n. 3-4, p.309-315, 2013.



PÉREZ-ALFONSO, C. O. et al. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. **International Journal of Food Microbiology**. v. 158, p. 101-106, 2012.

PÉREZ, R. C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1-2, p. 121-128, 2005.

PERMPALUNG, N. et al. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2015, doi:10.1093/jac/dkv008.

PESSOA, C. R. M. et al. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 6, 1133-1136, 2012.

PESTKA, S. Inhibitors of ribosome function. **Annual Review of Microbiology**, v. 25, p.488-562, 1971.

PESTKA, S. Chloramphenicol In Antibiotics Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents. Edited by J. W. Corcoran & F. E. Hahn. New York: Springer Verlag, v. 111, p. 370-395, 1975.

PETROU, M. A.; ROGERS, T. R. *In-vitro* activity of antifungal agents in combination with four quinolones. **Drugs Exp. Clin. Res.** v. 14, p. 9–18, 1988.

PIEREZAN, F. et al. Achados de necropsia relacionados coa a morte de 335 equinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 3, p. 275-280, 2009.

PINA-VAZ, P. et al. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. **European Academy of Dermatology and Venereology**. v. 18, p. 73-78, 2004.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, p. 1454-1462, 2009.

PIRES, L. **Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* - estudo in vitro e in vivo**. 2012. 154 f. Tese (Mestrado em Ciências – Física Aplicada, Física Bioaplicada– Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

PORTELA, R. A. et al. Doenças da cavidade nasal em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 10, p. 844-854, 2010.

POZZATTI, P. et al. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Can. J. Microbiol.** v. 54, p. 950-956, 2008.

PRASERTWITAYAKIJ, N. et al. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v. 33, n. 3, p. 204-214, 2003.

RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 3, p. 262-269, 2005.

- RAO A. et al. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.
- RAVISHANKAR, J. P. et al. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 34, n. 3, p. 167-175, 2001.
- RAWN, C.D.; SCHWARZ, M. Protection of *Pythium* species against antibacterial antibiotics by cholesterol. **Phytopathology**, v.77, p.319-323, 1987.
- RAWN, C.D.;VAN ETTEN, J.L. Antibiotic inhibition of protein synthesis in *Pythium ultimum*. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, v. 4, p.128-129, 1977.
- \_\_\_\_\_. A shake culture method for Pythiaceae applicable to rapid, small-scale assay of vegetative physiology. **Phytopathology**, v.68, p.1384-1388. 1978a.
- \_\_\_\_\_. Mechanism of Antibacterial Antibiotic Sensitivity in *Pythium ultimum*. **Journal of General Microbiology**, v.108, p.133-139, 1978b.
- REIS, JR. L. et al. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 289-295, 2003.
- REYNPRAYOON, U. et al. *Lagenidium* sp. Ocular infection mimicking ocular pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n.8, p. 2778-2780, 2013.
- RIET-CORREA, F.; FERREIRA, J. L. M.; SCHILD, A. L. Pitiose em cão. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico-UFPEL**, p. 55, 1998.
- RIET-CORREA, F. et al. Outbreaks of rhinofacial and rhinofaryngeal Zygomycosis in sheep in Paraíba, northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 29-35, 2008.
- RIFKIND, E.; CROWDER, E.D.; HYLAND, R.N. *In vitro* inhibition of *Coccidioides immitis* strains with amphotericin B plus rifampin. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.6, p.783-784, 1974.
- RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.
- RODRIGUES, C. et al. Intestinal dog pythiosis in Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 16, n. 1, p. 37-41, 2006.
- SALGUEIRO, L. R. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. **Planta Medica**. v. 69, n. 9, p. 871-874, 2003.

SALIPANTE, S. J. et al. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection by use of PCR screening and DNA sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 4, p. 1480-1483, 2012.

SANGRUCHI, T. et al. The pathological study of amputated limbs infected by *Pythium insidiosum*: to propose adequacy of surgical margins. **Siriraj Medical Journal**. v. 65, n.1, p. 1-5, 2013.

SANTOS, C. E. P. et al. Pitiose cutânea em equinos: diagnóstico diferencial. **Brasileira de Medicina Equina**. v. 32, n. 2, p. 24-27, 2010.

\_\_\_\_\_. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 8, 1397-1399, 2011a.

\_\_\_\_\_. Eficácia da imunoterapia no tratamento de pitiose facial em equino. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39, n. 1, p. 1-5, 2011b.

\_\_\_\_\_. Pitiose em animais de produção no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 12, p. 1083-1089, 2011c.

SANTOS, C. E. P. **A pitiose em equídeos e bovinos no Pantanal Matogrossense**. 2012. 131 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica Médica Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

SANTOS, C. E. P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian Pantanal and nearby areas: results of 76 cases. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 34, p. 270-274, 2014.

SANTOS, M. N.; LONDERO, A. T. Zigomicose subcutânea em cavalos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira - Série Veterinária**, v. 9, p. 7-8, 1974.

SANTURIO, J. M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosii in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, n. 3, p. 123-125, 1998.

SANTURIO, J. M.; LEAL, A. T.; MONTEIRO, A. B. Pythiose. In: LEFÉVRE, P. C.; BLANCOU, J.; CHERMETTE, R. (Ed). Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires de Bétail. 1. ed. Paris: Lavoisier. p. 1231-1241, 2003.

SANTURIO, J. M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosii developed and evaluated. **Vaccine**. v. 21, n. 19-20, p. 2535-2540, 2003.

\_\_\_\_\_. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 1-14, 2006a.

\_\_\_\_\_. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

\_\_\_\_\_. Granulomatous rhinitis in sheep associated with *Pythium insidiosum* infection. **The Veterinary Record**, v. 163, p. 276-277, 2008.

SATHAPATAYAVONGS, B. et al. Human pythiosis associated with thalassaemia hemoglobinopathy syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, 159, 274–280, 1989.

SATO, K. et al. Antimicrobial activity of DU-6859, a new potent fluoroquinolone, against clinical isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.36, p.1491–1498, 1992.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Iron and microbial infection. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 12, 946-953, 2004.

SCHLOEMER, N. J. et al. Fatal disseminated *Pythium insidiosum* infection in a child with diamond-blackfan anemia. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 21, n. 4, e24-e26, 2013.

SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia**, v. 95, n. 2, p. 200-208, 2003.

\_\_\_\_\_. Development of a species specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n.6, p. 2411-2418, 2004.

SCHATZ, G.; MASON, T. L. The biosynthesis of mitochondrial proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v.43, p.51-87, 1974.

SCHWARTZ, S. N. et al. Antifungal properties of polymyxin B and its potentiation of tetracycline as na antifungal agent. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 2, p.36-40, 1972.

SHEN, L. L. et al. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p.2778–2784, 1992.

SHEN, L. L.; FOSTEL, J. M. DNA topoisomerase inhibitors as antifungal agents. **Adv. Pharmacol.**, v.29, p.227–244, 1994.

SHENEP, J.L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

SHI, W.N. et al. The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: an *in vitro* interaction of antifungal and antibacterial agents. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 885–893, 2010

SHIPTON, W.A. Regulation by Ions of Zoospore release in *Pythium*. **Australian Journal of Botany**, v. 35, p. 79- 89, 1987.

SMITH, F. The pathology of bursattee. *Veterinary journal*. V. 19, n. 3, p.16-17, 1884.

SOKOVIĆ, M.D. et al. Chemical Composition of Essential Oils of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities. **Molecules**. v. 14, p. 238-249, 2009.

SRIPHANA, U. et al. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia**. v. 91, p. 39-43, 2013.

SUGINO, A. et al. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 74, p. 4767-4771, 1977.

SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**. v. 46, n.1, p. 41-52, 2008.

SUTHIWONG, J. et al. Coumarinoids from the fruits of *Micromelum falcatum*. **Fitoterapia**. v. 94, n. -, p. 134-141, 2014.

TABOSA, I. M. et al. Cutaneous pythiosis in horses and mules in Paraíba, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 27-30, 1999.

TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in Northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 4, p. 412-415, 2004.

THIANPRASIT, M.; CHAIPRASERT, A.; IMWIDHAYA, P. Human pythiosis. **Current Topics in Medical Mycology**. v. 7, n.1, p. 43-54, 1996.

THITITHANYANONT, A. et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1394-1400, 1998.

TRISCOTT, J. A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.

THONGSRI, Y. et al. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* using a single-tube Nested PCR. **Mycopathologia**. v. 176, n. 5-6, p. 369-376, 2013.

TONDOLO, J. S. et al. A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 93, n. 1, p. 52-54, 2013.

TROST, M. E. et al. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrointestinal canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 673-679, 2009.

TSAO, P. H. Selective media for isolation of pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**. v. 8, n. 1, p.157-186, 1970.

UBIALI, D. G. et al. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 2-3, p. 137-145, 2013.

- VANGDAL, M.; BERGAN, T. *In vitro* synergistic activity of norfloxacin and amphotericin-B against fungi. **Drugs Exp. Clin. Res.** v.10, p.433–444, 1984.
- VANITTANAKOM, N. et al. Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. **International Journal of Medical Microbiology**. 2013. In press. Doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.016.
- VAZQUEZ, J.A. Combination antifungal therapy for mold infection, **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 12, p. 1889-1901, 2008.
- VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 219-224, 2012.
- VORA, S. et al. Activity of Voriconazole Combined with Neutrophils or Monocytes against *Aspergillus fumigatus*: Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, n. 9, p. 2299-2303, 1998.
- SAHU R.; WALKER L. A.; TEKWANI B. L. *In vitro* and in vivo anti-malarial activity of tigecycline, a glycylicline antibiotic, in combination with chloroquine. **Malaria Journal**. v. 13, n. 1, p 1-7, 444, 2014.
- WALSH, T. J. et al. Augmentation of *in vitro* antifungal activity by norfloxacin, abstr. 971, p. 262. In Program and abstracts of the 23rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **American Society for Microbiology**, 1983.
- WELLEHAN, J. F. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 4, p. 564-568, 2004.
- WHITE, S. D. et al. Cutaneous pythiosis in a nontravelled California horse. **Veterinary Dermatology**. v. 19, n.6, p. 391-394, 2008.
- WILSON, E.L.; THORSON, L. and SPEERT, D. P. “Enhancement of Macrophage Superoxide Anion Production by Amphotericin B. Antimicrobial”. **Agents and Chemotherapy**. v. 35, n. 5, p. 796-800, 1991.
- WITKAMP, J. Bijdrage tot de Kennis van de *Hyphomycosis destruens*. **Nederlandsch-Indische Bladen voor Diergeneeskunde en Dierenteelt**. v. 36, n. 2, p.229-245, 1924.
- ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**. v. 93, p. 1051-1056, 2013.
- ZANETTE, R. A. et al. Enzymatic variability among Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 4, p. 264-266, 2013a.
- \_\_\_\_\_. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 826-830, 2013b.

\_\_\_\_\_. Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 5, 1144-1147, 2013c.

\_\_\_\_\_. *Toll*-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiology and Immunology**, 2013d. Doi: 10.1111/1348-0421.12082.

\_\_\_\_\_. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. **Journal Mycologie Médicale**. 2014. Doi: 10.1016/2014.09.002.

ZANETTE, R. A. **O papel do íon ferro nas infecções por *Pythium insidiosum***. 2014. 154 f. Tese (Doutorado em Farmacologia – Farmacologia Aplicada a Produção Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

## **8. ANEXOS**

---



## Anexo A – Carta de aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

**CARTA DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** "Avaliação in vitro e in vivo da susceptibilidade do oomiceto *Pythium insidiosum* frente antibióticos e antifúngicos associados"

**Numero do Parecer:** 055/2012

**Pesquisador Responsável:** Janio Morais Santurio

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:**

Santa Maria, 10 de Setembro de 2012.

Roselei Fachinetto  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM

## Anexo B – Certificado de Análise do Carvacrol

**SIGMA-ALDRICH**

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

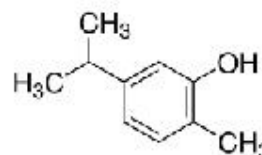
Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

**Certificate of Analysis**

**Product Name:**  
Carvacrol - ≥98%, FCC

**Product Number:** W224502  
**Lot Number:** MKBJ6205V  
**Brand:** ALDRICH  
**CAS Number:** 499-75-2  
**MDL Number:** MFCD00002236  
**Formula:** C10H14O  
**Formula Weight:** 150.22 g/mol  
**Quality Release Date:** 17 JAN 2012  
**Expiration Date:** JAN 2017



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless to Pale Yellow	Pale Yellow
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Refractive Index at 20 °C	1.521 - 1.526	1.524
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	≥ 98.0 %	99.7 %
Specific Gravity	0.974 - 0.980	0.975
Solubility (Turbidity)	Clear to Slightly Hazy	Slightly Hazy
1ml/4ml 60% Ethanol		
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow	Colorless
Arsenic (As)	< 3.0 ppm	< 1.0 ppm
Cadmium (Cd)	< 1.0 ppm	< 1.0 ppm
Mercury (Hg)	< 1.0 ppm	< 1.0 ppm
Lead (Pb)	< 10.0 ppm	< 1.0 ppm
Expiration Date Period		
5 Years		

Jamie Gleason, Manager  
 Quality Control  
 Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Anexo C- Certificado de análise do timol

**SIGMA-ALDRICH**

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

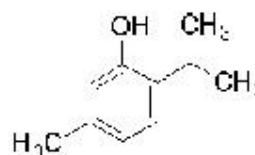
Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

**Certificate of Analysis**Product Name:  
Thymo - 99.9%

Product Number:	T0501
Lot Number:	071M0084V
Brand:	SIGMA
CAS Number:	89-83-8
MDL Number:	MFC00002309
Formula:	C10H14O
Formula Weight:	150.22 g/mol
Quality Release Date:	09 AUG 2011
Recommended Retest Date:	JUL 2014



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/ml of EtOH		
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
EmM	2.30 - 2.38	2.34
In EtOH		
Lambda Max	277 - 278 nm	277 nm
Purity (GC)	≥ 99.5 %	99.9 %
Recommended Retest Period		
3 years		

Rodney Burbach, Manager  
Analytical Services  
St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Anexo D: Metodologia

### **Avaliação *in vitro*:**

#### Local do Experimento

As avaliações *in vitro* e *in vivo*, foram desenvolvidas nas dependências do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### Amostras

Foram utilizadas 28 amostras brasileiras de *Pythium insidiosum*, isoladas de animais naturalmente infectados, e 2 amostras padrão ATCC 58637 e CBS 101555, totalizando 30 amostras testadas.

#### Preparação do Inóculo

Como *Pythium insidiosum* não forma conídios, há necessidade de promover-se a zoosporogênese para cada isolado, a qual rende, em média, 20.000 zoósporos/mL. O inóculo utilizado, obtidos por meio do processo de zoosporogênese, continha 2.500 zoósporos/mL.

#### Zoosporogênese

As amostras de *Pythium insidiosum* previamente cultivadas em Corn Meal Agar foram repicadas para placas de petri contendo o mesmo meio de cultivo, juntamente

com pedaços de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavados a 121<sup>o</sup>C por 20 minutos. As placas foram incubadas por um período de 5 dias a temperatura de 37<sup>o</sup>C. Após esse período de cultivo, os pedaços de grama parasitados pelo *Pythium insidiosum* foram transferidos para uma placa de petri contendo 30 mL de Meio de Indução, composto pela solução A [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 500 mL de água destilada estéril] e solução B [MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> em 250 mL de água destilada estéril]. O meio de indução foi formado por 0,5 mL da solução A e 0,1 mL da solução B em 1000 mL de água destilada estéril. As placas de petri contendo o Meio de Indução juntamente com os pedaços de grama infectados foram incubados a 37<sup>o</sup>C por 8 horas. Durante esse período, as gramas foram regularmente observadas, em intervalos de 1 hora, através de microscopia ótica (100 e 400 x) entre lâmina e lamínula. Após observação da formação de zoosporângios e liberação dos zoósporos, realizou-se a contagem de zoósporos livres no meio de indução, utilizando-se hemocitômetro de Neubauer.

#### Técnicas

#### Método padrão CLSI (2008)

As avaliações das combinações de drogas foram baseadas na técnica do “checkerboard” (BONAPACE et al., 2002) realizada em microdiluição, seguindo o protocolo internacional M 38-A2 determinado pelo CLSI ( Clinical Laboratory Standards Institute, 2008).

O inóculo final utilizado no desenvolvimento da macrotécnica consistiu de 1 mL do meio de indução contendo entre 20.000 – 30.000 zoósporos/mL acrescido de 9 mL de meio RPMI 1640 com L-glutamina, glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de MOPS (ácido morfolínico propanosulfônico), onde a concentração final correspondeu a 2.500 zoósporos/mL. Os antifúngicos, Caspofungina (Merck Sharp & Dohme), Terbinafina (Novartis), Itraconazol (Sigma Pharma), Voriconazol (Sigma Pharma), Anfotericina B (Bristol Myers Squibb Farmacêutica) e os antibacterianos Minociclina (Pharma Nostra), Tigeciclina (Pharma Nostra), azitromicina (Pharma Nostra) e

claritromicina (Pharma Nostra), foram previamente diluídos (solução estoque), obtendo-se assim a concentração final das drogas. O inóculo final deverá continha 2500 zoósporos/mL. E a partir deste, foram transferidos 0,1 mL para as cavidades das placas de microtitulação contendo 0,5 mL em diferentes concentrações de ambas as drogas, contabilizando 0,1 mL de drogas associadas.

Após a incubação a 37°C durante 24 – 48 horas, foi determinada a:

- CIM (Concentração Inibitória Mínima) 100% = menor concentração da droga capaz de inibir 100% do inóculo;
- CIM50% = menor concentração da droga capaz de inibir 50% do inóculo, comparado com o controle;
- Concentração efetiva mínima (CEM) = menor concentração capaz de causar distorções nas hifas; esta é uma leitura realizada em microscópio, atualmente utilizada para testes com equinocandinas;

As leituras permitiram determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) e foram interpretadas como sinérgicas ( $ICIF \leq 0,5$ ), indiferentes ( $0,5 < ICIF \leq 4$ ) e antagônicas ( $ICIF > 4$ ) (JOHNSON *et al.*, 2004). A leitura visual foi realizada de acordo com as técnicas propostas por Bonapace *et al.* (2002).

### **Avaliação *in vivo*:**

#### Local do Experimento

O experimento foi desenvolvido nas instalações da área experimental, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Maria.

## Animais

foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia, sendo machos e fêmeas, de 3 meses de idade. Os animais sem pitiose foram divididos em 8 grupos (n=5) para os tratamentos com drogas e controle negativo, e oito grupos com pitiose experimental com seis animais, sendo mantidos em gaiolas individuais. A alimentação diária foi constituída de 100 gramas de ração comercial para coelhos, fibras vegetais e água *ad libidum*. Antes do início do experimento, todos os animais foram pesados e identificados pela numeração da gaiola.

## Indução da Zoosporogênese

A indução da zoosporogênese para posterior inoculação dos animais foi realizada conforme descrita no item 3.1.4.

## Inoculação dos Animais

Os animais submetidos a pitiose experimental foram inoculados com 1mL de meio de indução contendo aproximadamente 20.000 zoósporos viáveis de *Pythium insidiosum*. A inoculação foi feita por via subcutânea no lado direito da região das costelas, utilizando-se seringas descartáveis estéreis. No local de injeção, antes e após a realização desta, foi realizada a anti-sepsia com álcool 70%. Imediatamente antes da inoculação foi realizada a medida da pele dos animais, sendo esta considerada a medida número 1.

Os animais foram inspecionados diariamente para avaliação do crescimento das lesões. Quando todos os animais evidenciarem lesões visíveis, aproximadamente 21 dias após a inoculação, foram tomadas as medidas das mesmas para posterior divisão dos grupos, assegurando a proporção do tamanho de lesões entre os grupos.

## Desenho Experimental

Animais saudáveis: para controle da toxicidade das drogas animais saudáveis foram divididos em grupos (n=5) e tratados com os antibacterianos em monoterapia e terapia combinada por via oral (v.o.) ou intraperitoneal (i.p.). Constituindo os grupos: azitromicina (20mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5), claritromicina (20mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5), Minociclina (10mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5), tigeclina (1,5mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5), e Minociclina (10mg/Kg/dia, vo, 12/12h) com azitromicina (20mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5) ou claritromicina (20mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5) ou tigeclina (1,5mg/Kg/dia, i.p., 12/12h, n=5). Um grupo de coelhos (n=5) sem doença e tratados com solução salina foram utilizados como controle negativo da doença.

Animais com pitiose: para avaliação do potencial dos antibacterianos em conter a pitiose em monoterapia e terapia combinada, foram utilizados coelhos com pitiose experimental distribuídos em grupos (n=6). Constituindo os grupos: azitromicina (20mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5), claritromicina (20mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5), Minociclina (10mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5), tigeclina (1,5mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5), e Minociclina (10mg/Kg/dia, vo, 12/12h) com azitromicina (20mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5) ou claritromicina (20mg/Kg/dia, vo, 12/12h, n=5) ou tigeclina (1,5mg/Kg/dia, i.p., 12/12h, n=5). Um grupo de coelhos (n=5) com pitiose experimental sem tratamento foram utilizados como controle positivo da doença.

## Avaliação Hematológica e Perfis Bioquímicos

A análise hematológica foi realizada por hemograma no aparelho da marca BC-2800 Vet Auto Hamatology Analyzer Mindray® (China) e a contagem diferencial de leucócitos foi feita utilizando-se a coloração rápida de Panótico e observação microscópica (400X). A avaliação bioquímica do estado funcional do fígado incluiu as dosagens de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e BL (bilirrubina), enquanto a bioquímica das alterações renais incluirá as dosagens de creatinina e uréia. As análises serão realizadas por meio de kits



bioquímicos e processadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### Coleta de Sangue

A coleta de sangue dos animais foi realizada antes da inoculação, 21 dias após a inoculação dos animais e a cada 30 dias até o término do experimento. O sangue foi coletado por punção punça da veia safena lateral, utilizando-se seringas estéreis descartáveis. O local da punção recebeu antissepsia com álcool 70%. Foram coletadas amostras de aproximadamente 6 mL de sangue de cada animal, sendo estas amostras divididas em 2 tubos, um contendo anticoagulante e outro sem anticoagulante. Depois de coletadas, foram imediatamente remetidas ao laboratório para posterior análise.

#### Necropsia dos Animais

Ao final do experimento todos os animais foram eutanasiados. A eutanásia realizou-se conforme métodos recomendados para evitar o sofrimento dos animais. Imediatamente após a eutanásia, os animais foram necropsiados e as lesões coletadas para análises histopatológicas e micológicas.

#### Histopatologia

Fragmentos das lesões, assim como porções de órgãos dos animais necropsiados foram acondicionados em vidros contendo formol tamponado 10% e enviados ao laboratório de patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para posterior análise histopatológica. Os fragmentos de tecidos foram incluídos em parafina, cortados em secções de 5  $\mu$ m e submetidos às colorações de Hematoxilina – Eosina (HE) e impregnação pela prata (Grocott). Foram avaliadas as lesões histopatológicas de cada

tratamento, comparando-as com as lesões dos animais do grupo controle, as lesões foram classificadas em cruces onde uma cruz indicava pequena quantidade de hifas e cinco cruces uma grande quantidade de hifa.

#### Análise Micológica

Fragmentos de lesões foram coletadas em placas de petri estéreis e utilizados para o re-isolamento de *Pythium insidiosum*. A análise foi processada no Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os fragmentos foram cortados em pequenos pedaços, lavados com solução de antibacterianos (ampicilina 64 mg/mL) e semeados em meio de cultura caldo Sabouraud, ficando incubados em estufa bacteriológica a 37<sup>0</sup>C, por 48 – 72 horas. Após crescimento foi realizada análise microscópica utilizando-se corante azul de algodão. Posteriormente, as amostras foram repicadas para Corn Meal Agar e novamente submetidas à zoosporogênese para identificação de estruturas características de *Pythium insidiosum*.

#### Análise molecular

Pequenos fragmentos das lesões e dos órgãos com metástase foram coletados para identificação molecular de *Pythium insidiosum*. Os fragmentos foram colocados em eppendorfs estéreis e armazenados em nitrogênio líquido até a extração. O DNA total foi isolado com Kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen). As concentrações de DNA foram determinadas usando espectrofotometria.

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores específicos para *P. insidiosum*: PI1 (50-TTCGTCGAAGCGGACTGCT-30) e PI2 (50-GCCGTACAACCCGAGAGTCATA-30) (Invitrogen). Estes iniciadores correspondem a um segmento do gene ITS1 rDNA (Grooters & Gee, 2002). As reações de amplificação foram realizadas em 25µl contendo 50 ng de DNA molde, 3 µM de cada iniciador, 100 µM de uma mistura de dNTP (concentração final de 25 µM de cada nucleotídeo) (Invitrogen), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 unidades de Taq polimerase (Invitrogen) e 2,5 µl de tampão da enzima. Todas as amplificações foram realizadas usando

termociclador programável (PTC-100, MJ Research) com os seguintes parâmetros dos ciclos: desnaturação inicial a 94 °C durante 3 min, 28 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 s, anelamento a 65°C durante 30 s, extensão a 72 °C durante 30 s, e extensão final a 72 ° C durante 10 min. Uma alíquota de 10 µl de cada reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e visualizadas sob luz ultravioleta. Amostras previamente sequenciadas e identificadas como *Pythium insidiosum* e *Penicillium sp.* foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, nas reações de PCR.

## Elisa

### Amostras de soro

Amostras de soro foram coletadas dos animais antes da inoculação, 21 dias pós inoculação e a cada 30 dias após inicio do tratamento até o término do experimento, contabilizando 4 coletas.

### Preparo do antígeno

Fragmentos de cultivos de *P. insidiosum* DMVP 118/98 (CBS 101555) foram inoculados em caldo Sabouraud dextrose e incubados a 37 °C sob agitação de 120 rpm (rotações por minuto) durante 6-7 dias. A cultura após inativação com timerosal (0,02%) foi filtrada. A massa fúngica retida foi pesada e ressuspensa (1g massa

fúngica/5mL PBS) em tampão fosfato 0,02M pH 7,4 (PBS -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e KCl). Essa massa foi sonicada (23 watts com pulsos de 30 segundos durante 3 minutos) em banho de gelo. O material resultante da sonicação foi centrifugado a 7.000 rpm durante 15 minutos e, o sobrenadante obtido foi coletado como antígeno solúvel. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry modificado, usando albumina bovina como padrão (1 mg/mL).

### **Sensibilização das placas e realização do teste**

Placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano (Corning Costar Corporation – Cambridge – MA – USA), foram sensibilizadas com antígeno solúvel (10  $\mu\text{g}/\text{poço}$ ) diluído em tampão carbonato 0,05M pH 9,6 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ) e incubadas “overnight” a 4 °C para adsorção do mesmo na superfície da placa. Após a incubação, as placas foram lavadas com tampão PBS 0,02M pH 7,2 (NaCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), secas a 37 °C por 10 minutos e armazenadas a 4 °C até o momento do uso.

Para realização dos testes as placas foram inicialmente bloqueadas com 100  $\mu\text{L}$  de solução de albumina bovina 0,2% por cavidade e incubadas a 37 °C/1h. Os soros testes foram diluídos em PBS 7,2 (1:2.000), distribuídos nas placas (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) e incubados por uma hora a 37 °C. Cada amostra testada foi submetida a 2 repetições por placa e 5 repetições interplacas, totalizando 10 repetições por amostra. Após a incubação com anticorpo primário as placas foram lavadas 4x com solução de lavagem (PBS 7,4 com 0,05% de Tween 20) e submetidas à incubação com anticorpo secundário espécie específico (anti-IgG conjugado com peroxidase), na diluição 1:10.000. A seguir, as placas foram novamente lavadas para, finalmente, receber 100  $\mu\text{L}$  do substrato cromogênico (orthophenylene-diamine, OPD) diluído em tampão citrato-fosfato 0,15M pH 5,0 (solução A: ácido cítrico 21g/100mL + solução B:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  53,6g/1000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ). Passados os 15 minutos, a reação foi bloqueada com 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N, e a leitura realizada em espectrofotômetro de microplacas, com filtro de 490 nm.

**Ponto de corte do teste**

O ponto de corte (*cut-off*) do teste foi calculado pela média das amostras negativas acrescida de três vezes o desvio padrão dessas amostras, onde o número de desvio-padrão utilizados na fórmula garante o nível de confiança do resultado.

$$\text{Cut-off} = \mu \text{ DO} + 3x s \text{ (99,8\% de confiança)}.$$