

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

**Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* da terbinafina, itraconazol, caspofungina,
ibuprofeno e fluvastatina, em combinações duplas e triplas, frente a
*Pythium insidiosum***

Juliana Siqueira Argenta

PORTO ALEGRE

2012

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

**Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* da terbinafina, itraconazol, caspofungina,
ibuprofeno e fluvastatina, em combinações duplas e triplas, frente a
*Pythium insidiosum***

Autor: Juliana Siqueira Argenta

Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, na área de Microbiologia,
especialidade em Micologia.

Orientador: Prof. Dr. Laerte Ferreira

PORTO ALEGRE

2012

Juliana Siqueira Argenta

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA TERBINAFINA, ITRACONAZOL,
CASPOFUNGINA, IBUPROFENO E FLUVASTATINA, EM COMBINAÇÕES
DUPLAS E TRIPLAS, FRENTE A *Pythium insidiosum*

Aprovada em 29 MARÇO 2012

APROVADA POR:

Prof. Dr. Laerte Ferreira

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Sandro Antonio Pereira

Membro da Comissão

Prof. Dr. Daniela Isabel Brayer Pereira

Membro da Comissão

Prof. Dr. Luiz Carlos Severo

Membro da Comissão

Dedico aos Mestres:

Janio Moraes Santurio, Sydney Hartz Alves e Laerte Ferreira.

Por todos os ensinamentos, oportunidades e confiança!

AGRADECIMENTOS

À minha avó Maria Helena pelo amor, dedicação, apoio constante para realização deste trabalho e principalmente por acreditar em mim.

Aos meus pais, Nilia e Jânio, e meu irmão Miguel pelo incentivo, carinho e apoio para que eu aqui chegasse.

A Dra Daniela I. B. Pereira, minha sempre amiga e colega Dani, pelo companheirismo e incansável ajuda para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas e amigos Flávio Silveira, Grazieli Maboni, Ayrton Cavalheiro, Deise Santurio, Maria Isabel Azevedo, Régis Zanette, Patrique Pereira, Érico Loretto. Muito obrigada pelo apoio, pela amizade e por todas as palavras de incentivo.

A minha nova família, Thobias, Ana, Márcio, Gabi e Juninho, pelo carinho, amizade e por tornar a minha vida melhor.

Aos novos colegas e amigos, Dr. Buzzeto, Dr. Revir, Alceu, Rogério, Bugre, Baixinha, Rosane, Gerson, Ricardo, Maria, Alemão e Casagrande, pela paciência, amizade, pelas palavras de incentivo e apoio.

Aos amigos Aline Borba e Ismael Queiroz por fazerem parte da minha história e ter tornado tudo mais divertido e descomplicado.

Aos Professores e Funcionários do PPGCV da UFRGS, por possibilitarem e facilitarem a realização do doutorado.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Pythium insidiosum, um micro-organismo do Reino Stramenopila, é o agente etiológico da pitiose em mamíferos, uma doença difícil de tratar. O presente estudo investigou a atividade inibitória *in vitro* da terbinafina, itraconazol, caspofungina, fluvastatina e ibuprofeno contra 15 isolados brasileiros de *P. insidiosum* em combinações duplas e triplas e determinou as correlações *in vivo* usando coelhos com pitiose experimental. Além disso, este estudo objetivou relatar o crescimento paradoxal de isolados de *P. insidiosum* quando submetidos a testes de suscetibilidade *in vitro* com caspofungina. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo protocolo M 38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, e as interações *in vitro* foram avaliadas usando um método de microdiluição *checkerboard*. Para o estudo *in vivo*, 20 coelhos inoculados com zoósporos de *P. insidiosum* foram divididos em quatro grupos: o grupo 1 foi tratado com terbinafina e itraconazol; o grupo 2 foi tratado com terbinafina, itraconazol e fluvastatina; o grupo 3 foi tratado com terbinafina e caspofungina; e o grupo 4 foi o grupo controle. As combinações de terbinafina com caspofungina ou ibuprofeno foram sinérgicas para 47% dos isolados, e antagonismo não foi observado em nenhuma das combinações duplas. As combinações triplas foram principalmente indiferentes, mas sinergismo e antagonismo também foram observados. O crescimento paradoxal foi observado em 50% dos isolados testados a concentrações acima da CIM variando de 16 a 128 mg/ml. No estudo *in vivo*, o aspecto histológico das lesões foi similar entre os grupos, mas o grupo 2 mostrou a menor quantidade de hifas e diferiu significativamente dos outros grupos. Os melhores resultados *in vivo* foram observados quando utilizada a combinação tripla de terbinafina, itraconazol e fluvastatina (grupo 2). O presente estudo foi o primeiro estudo de suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* com *P. insidiosum* usando combinações de três fármacos, e o fenômeno do efeito paradoxal envolvendo oomicetos foi descrito aqui pela primeira vez.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*, terbinafina, itraconazol, caspofungina, ibuprofeno, fluvastatina, testes de suscetibilidade, efeito paradoxal, coelhos.

ABSTRACT

Pythium insidiosum, a fungus-like microorganism of the Stramenopila kingdom, is the etiological agent of pythiosis in mammals, a difficult disease to treat. The present study investigated the *in vitro* inhibitory activity of terbinafine, itraconazole, caspofungin, fluvastatin and ibuprofen against 15 isolates of Brazilian *P. insidiosum* in double and triple combinations and determined *in vivo* correlations using rabbits with experimental pythiosis. Furthermore, this study aimed to report the paradoxical growth of *P. insidiosum* strains when submitted to *in vitro* susceptibility tests with caspofungin. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute M 38-A2 protocol, and the *in vitro* interactions were evaluated using a checkerboard microdilution method. For the *in vivo* study, 20 rabbits inoculated with *P. insidiosum* zoospores were divided into four groups: group 1 was treated with terbinafine and itraconazole; group 2 was treated with terbinafine, itraconazole and fluvastatin; group 3 was treated with terbinafine and caspofungin; and group 4 was the control group. Combinations of terbinafine with caspofungin or ibuprofen were synergistic for 47% of the isolates, and antagonism was not observed in any of the double combinations. The triple combinations were mostly indifferent, but synergism and antagonism were also observed. The paradoxical growth was observed in 50% of the isolates tested at concentrations above the minimal inhibitory concentration (MIC) ranging from 16 to 128 mg/ml. In the *in vivo* study, the histological aspect of the lesions was similar among the groups, but group 2 showed the lowest amount of hyphae and differed significantly from the other groups. The best *in vivo* results were observed using the triple combination of terbinafine, itraconazole and fluvastatin (group 2). The present study was the first study of *in vitro* and *in vivo* susceptibility of *P. insidiosum* using combinations of three drugs, and the phenomenon of paradoxical effect involving oomycetes was described here for the first time.

Keywords: *Pythium insidiosum*, terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen, fluvastatin, susceptibilities tests, paradoxical effect, rabbits.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

FIGURA SUPLEMENTAR

FIGURA 1- Percent variation of subcutaneous lesioned areas in rabbits experimentally inoculated with *Pythium insidiosum* and treated with a combination of terbinafine and itraconazole (group 1); terbinafine, itraconazole and fluvastatin (group 2); terbinafine and caspofungin (group 3), or control (group 4).....59

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1- Caspofungin MICs and PG characteristics of twenty clinical <i>Pythium insidiosum</i> isolates.....	50
--	----

ARTIGO 2

TABELA 1- <i>In vitro</i> susceptibility of <i>Pythium insidiosum</i> (n = 15) to terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin.....	55
--	----

TABELA 2- <i>In vitro</i> susceptibility of <i>Pythium insidiosum</i> (n = 15) to terbinafine combined with itraconazole, ibuprofen, fluvastatin or caspofungin and itraconazole combined with fluvastatin or ibuprofen.....	55
--	----

TABELA 3- <i>In vitro</i> susceptibility of <i>Pythium insidiosum</i> (n = 15) against the triple combinations of terbinafine, itraconazole and fluvastatin; terbinafine, itraconazole and ibuprofen; terbinafine, itraconazole and caspofungin; and terbinafine, fluvastatin and caspofungin.....	56
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	47
4	DISCUSSÃO.....	60
5	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum, classe *Oomycete*, é o agente etiológico da pitiose (DE COCK *et al.*, 1987), uma doença caracterizada por lesões granulomatosas eosinofílicas, no qual em poucos casos obteve-se cura através de terapia com antifúngicos.

Destaca-se a pitiose entre as doenças emergentes que acomete o homem e os animais (SANTURIO *et al.*, 2006). A espécie equina é vítima frequente e o Brasil, o país com o maior número de casos, sobretudo em planícies alagadiças como o Pantanal mato-grossense (LEAL *et al.*, 2001a). As frequentes falhas terapêuticas e morbidade da doença determinam o sacrifício destes animais, resultando em prejuízos econômicos. Para o tratamento dos animais a imunoterapia tem sido encorajadora (MENDOZA *et al.*, 2003; SANTURIO *et al.*, 2003b), mas o grande desconhecimento deste oomiceto e de sua suscetibilidade a antifúngicos colocam a pitiose humana no grupo das micoses desconhecidas e de evolução fatal.

A pitiose é uma doença crônica, observada mais frequentemente em equinos e caninos. Casos esporádicos também tem sido relatados em bovinos, felinos (MENDONZA & NEWTON, 2005), ovinos (TABOSA *et al.*, 2004; SANTURIO *et al.*, 2008) e espécies não domésticas como jaguar (CAMUS *et al.*, 2004), urso (GROOTERS, 2003) e camelo (WELLEHAN *et al.*, 2004). No homem, é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum no sudeste da Ásia (IMWIDTHAYA, 1994 a,b).

No Brasil, a pitiose foi descrita em equinos, bovinos, ovinos e caninos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em equinos. A primeira descrição de pitiose equina ocorreu no Rio Grande do Sul (SANTOS & LONDERO, 1974). Desde então, vários relatos da doença em diferentes estados do Brasil comprovam a existência da pitiose equina em todo o país (SANTOS *et al.*, 1987; MEIRELES *et al.*, 1993; TÚRY & COROA, 1997; MONTEIRO, 1999; TABOSA *et al.*, 1999; RODRIGUES & LUVIZOTTO, 2000; SANAVRIA *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2001a; SALLIS *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2003; HEADLEY & ARRUDA, 2004).

A doença é progressiva, levando o animal ao emagrecimento e à morte em 100% dos casos se não tratados. De acordo com MILLER (1981), o caráter progressivo da enfermidade sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio da mesma, pois mesmo as hifas sendo antigênicas, não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro, devido à marcante reação inflamatória. Uma vez dentro do hospedeiro, *P. insidiosum* induz a uma reação granulomatosa eosinofílica com células gigantes, mastócitos, macrófagos e poucos linfócitos. Os eosinófilos na tentativa de fagocitar o micro-organismo são degranulados sobre a hifa. Em equinos, esta reação é extremamente pronunciada, o que leva a formação de massas firmes semelhantes a corais, conhecidas como *kunkers*, compostas por eosinófilos degranulados intercalados por hifas viáveis de *P. insidiosum* (MENDONZA *et al.*, 1996). Acredita-se que essas estruturas ajudem na proteção do fungo frente às células de defesa do hospedeiro, pois o agente fica preservado dentro do material eosinofílico. Sendo assim, esta estratégia pode proteger o patógeno do reconhecimento pelo sistema imunológico, assegurando

sua presença nos tecidos infectados (MILLER, 1981; MENDONZA *et al.*, 1992a; MENDONZA *et al.*, 2003).

O tratamento da pitiose em animais e humanos é dificultado pelas peculiaridades do agente etiológico, notadamente a ausência de ergosterol na membrana plasmática, componente alvo de ação da maioria dos fármacos antifúngicos. Por isso, os fármacos antifúngicos são ineficientes e a maioria dos animais atingidos não sobrevive em decorrência da infecção (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Mesmo assim, várias tentativas de tratamento foram realizadas utilizando fármacos antifúngicos isoladamente como anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol e compostos iodínicos com resultados desanimadores. Entretanto, algumas tentativas de terapia com fármacos que atuam na síntese do ergosterol tem demonstrado cura clínica em poucos cães e em um paciente humano com pitiose (SHENEP *et al.*, 1998; GROOTERS, 2003).

Miller (1981) utilizou um imunoterápico produzido a partir de hifas inativadas e sonicadas de *P. insidiosum* e obteve cura em 53% dos animais tratados, observando um aumento deste índice quando a imunoterapia foi precedida por cirurgia. Em contrapartida aos resultados obtidos em equinos, a imunoterapia em cães e gatos tem sido desapontadora. Somente 33% dos caninos e nenhum dos gatos tratados responderam ao tratamento (MENDONZA & NEWTON, 2005).

Embora os índices de cura obtidos com a utilização do imunoterápico sejam bons e apresente baixo custo, existem muitos casos não responsivos a imunoterapia. Associado a este fato, a maioria dos fármacos antifúngicos disponíveis atuam inibindo a síntese do ergosterol, ausente na membrana do *P. insidiosum*, o que restringe o número de fármacos que podem ser utilizadas para o

tratamento da enfermidade. Nestas situações, há necessidade de uma alternativa terapêutica eficaz. Tendo em vista a quantidade de agentes antifúngicos disponíveis e os diversos efeitos colaterais e toxidez provocados pelos mesmos, uma opção é a terapêutica combinada, utilizando associações duplas ou triplas entre medicamentos antifúngicos e não antifúngicos (GALGÓCZY *et al.*, 2011).

A terapia combinada constitui-se numa alternativa à terapia individual, especialmente para pacientes com infecções invasivas difíceis de tratar. As associações de antifúngicos de diferentes classes é um caminho a ser percorrido pela pesquisa; na pitiose humana, há relatos de sucesso pela combinação terbinafina e itraconazol (SHENEP *et al.*, 1998). As demais associações, envolvendo fármacos mais modernos estão aguardando estudos que demonstrem seus potenciais.

A terbinafina pertence ao grupo das alilaminas e atua especificamente em um estágio precursor de biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima esqualeno-epoxidase (GOSBELL *et al.*, 2003). O itraconazol e outros azólicos atuam reduzindo a síntese de ergosterol através da inibição do citocromo P450 (GOSBELL *et al.*, 2003). Ambas as enzimas estão envolvidas na rota de biossíntese do ergosterol na membrana celular fúngica, portanto, a combinação de terbinafina e azólicos poderia proporcionar sinergismo pelo bloqueio sequencial desta rota (KOWALSKY & DIXON, 1991, MELETIADIS *et al.*, 2003).

A caspofungina é um antifúngico derivado das equinocandinas, cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição não competitiva da enzima β (1,3) -D-glucana sintetase. Desta forma, impede a síntese de β -glucanas da parede celular, componente essencial para integridade estrutural e estabilidade osmótica das

células fúngicas. A associação de outros fármacos provavelmente potencialize a ação da caspofungina no tratamento da pitiose, uma vez que este oomiceto apresenta grande quantidade de β glucana na sua parede celular (GROOTERS, 2003).

Ibuprofeno é um anti-inflamatório não esteroidal que tem mostrado atividade antifúngica contra *Candida albicans* e efeito sinérgico sobre isolados de *P.insidiosum* quando combinados com antifúngicos (CAVALHEIRO *et al.*, 2009b). A fluvastatina, uma estatina sintética, é um fármaco redutor de colesterol que age inibindo uma enzima limitante na via de biossíntese de colesterol (CHIN *et al.*, 1997). Estudos tem mostrado sinergismo entre estatinas e azóis contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e zigomicetos (QIAO *et al.*, 2007).

Na busca por novas opções terapêuticas para pitiose, este estudo teve como objetivos:

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* do *P. insidiosum* aos antifúngicos terbinafina, itraconazol e caspofungina; ao anti-inflamatório ibuprofeno; e ao hipocolesterolemiantes fluvastatina;
- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* do *P. insidiosum* frente às associações duplas e triplas destes fármacos;
- Determinar a correlação *in vivo* dessas associações utilizando coelhos com pitiose experimental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A pitiose é uma enfermidade crônica, piogranulomatosa que atinge principalmente equinos, caninos, bovinos e o homem. Ocorre em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas (MEIRELES *et al.*, 1993; MENDOZA *et al.*, 1996), sendo causada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum* (DE COCK *et al.*, 1987), atualmente classificado no Reino *Stramenopila*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* (MENDONZA & NEWTON, 2005).

A espécie equina é a mais atingida por este agente, principalmente nas formas cutânea e subcutânea (MENDOZA *et al.*, 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). A segunda espécie mais atingida é a canina e as infecções manifestam-se pela formação de piogranulomas gastrointestinais e cutâneos (MILLER *et al.*, 1983; FOIL *et al.*, 1984; SMITH *et al.*, 1989; HOWERTH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; GROOTERS, 2003). 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) e ovinos (TABOSA *et al.*, 2004; SANTURIO *et al.*, 2008). Em humanos, a doença é comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, apresentando-se nas formas subcutânea, oftálmica e sistêmica, sendo que as formas cutâneas e sistêmicas estão associadas a α e β -talassemia, comuns nessa região (IMWIDTHAYA, 1994a,b). Nas espécies não

domésticas, *P. insidiosum* foi reconhecido como causa de doença pulmonar primária num jaguar (*Pantera onca*) da América Central (CAMUS *et al.*, 2004), causando lesões cutâneas e gastrintestinais em um urso de zoológico (GROOTERS, 2003) e lesão mandibular subcutânea em um camelo (WELLEHAN *et al.*, 2004). Pesavento *et al.* (2008) publicou o primeiro relato deste oomiceto como causador de pitiose cutânea em pássaros.

Estudos taxonômicos, 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* (KWON-CHUNG, 1994). 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, um componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, no qual aparecem como componentes predominantes, celulose e β -glucana (GROOTERS, 2003). Também os oomicetos diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, não sendo o principal esteróide. No entanto, espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium*, e *Phytophthora* incorporam esteróides do ambiente (esteróides auxotróficos), ao contrário do que ocorre com os fungos. De acordo com Grooters (2003), os esteróides são importantes para produção de estruturas reprodutivas *in vitro*, não sendo necessários para o crescimento vegetativo.

O gênero *Pythium* caracteriza-se principalmente por apresentar parede celular composta de β -glucanas, celulose e hidroxipolina; talo diplóide; mitocôndria com crista tubular; reprodução assexuada com produção de zoósporos biflagelados;

reprodução sexuada oogâmica (MOORE-LANDECKER, 1996; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Esse gênero possui mais de 120 espécies distribuídas no mundo inteiro, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas, mas apenas a espécie *P. insidiosum* é conhecida como patógeno de mamíferos (LEAL *et al.*, 2001b).

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, tendo sido relatada na Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua-Nova Guiné, Tailândia (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996; MENDOZA *et al.*, 1996; MENDONZA & NEWTON 2005), Venezuela (PÉREZ *et al.*, 2005) e África (RIVIERRE *et al.*, 2005). Não há predisposição por sexo, idade ou raça e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre os animais ou entre animais e o homem (MENDOZA *et al.*, 1996). Comumente, observa-se que os animais afetados permanecem por longos períodos em contato com águas paradas em lagos, açudes ou locais pantanosos. Provavelmente, altas temperaturas e precipitação pluviométrica mantêm as condições necessárias para reprodução do *P. insidiosum* (CHAFIN *et al.*, 1995).

Segundo Miller & Campbell (1982a), para haver a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30° e 40°C e o acúmulo de água. Estas condições parecem essenciais, uma vez que a grande maioria dos casos de pitiose foi observada durante ou após a estação chuvosa. Essas características podem ser observadas no Pantanal Matogrossense, onde a maioria dos casos de pitiose equina foi registrada entre os meses de fevereiro e maio (verão-outono), período que corresponde ao ápice das cheias (LEAL *et al.*, 2001a), e na Paraíba onde a

maioria dos casos relatados foi registrada sete a dez meses após o início das chuvas na região (TABOSA *et al.*, 1999).

Miller (1983) propôs um ciclo que se baseia na colonização de plantas aquáticas e posterior formação de zoosporângios. Os zoósporos livres na água movimentam-se até encontrar outra planta (ou animal), onde se encistam e emitem tubos germinativos, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo.

Análises *in vitro* demonstraram que a quimiotaxia dos zoósporos por pelos, tecido animal e vegetal é atribuída a substâncias presentes nessas estruturas. Uma substância amorfa é liberada pelo zoósporo após o seu encistamento, sendo provavelmente produzida em resposta ao fator quimiotáxico do hospedeiro. Segundo os autores, essa substância, que pode ser uma glicoproteína, age como um adesivo para ligar o zoósporo à superfície do hospedeiro, permitindo a formação de tubo germinativo, constituindo-se num importante fator de virulência do patógeno (MENDOZA *et al.*, 1993). Essas observações sustentaram a teoria de infecção, sugerindo que os cavalos em contato com águas contaminadas poderiam atrair os zoósporos, os quais germinariam a partir de uma pequena lesão cutânea (MILLER, 1983; MENDOZA *et al.*, 1993). Os estudos de Ravishankar *et al.* (2001) demonstraram que os ápices das hifas de *P. insidiosum* exerceram forças de 6,9 μ N quando testado contra diferentes superfícies, incluindo pele humana e animal. Porém, observaram que esta força não foi suficiente para penetrar a pele intacta, mostrando, portanto, que este patógeno requer lesões prévias na pele para infectar os tecidos do hospedeiro. Os autores demonstraram também, que este micro-organismo pode reduzir a resistência tecidual através da secreção de proteases.

Resultados similares foram encontrados por MacDonald *et al.* (2002). Entretanto, Santurio *et al.* (1998) sugeriram a possibilidade de penetração dos zoósporos através dos folículos pilosos, baseados na detecção de hifas no interior do folículo de bovinos infectados naturalmente e no fato do quimiotaxismo ser mais ativo na região do pelo encontrada dentro do folículo piloso. Essa observação pode questionar a necessidade de lesão na pele para que ocorra a germinação dos zoósporos. Por outro lado, em relatos acompanhados no Brasil, foi possível detectar diferenças na suscetibilidade de equinos à infecção. Comparando-se com os dados de pitiose humana, no qual a maior parte dos casos ocorre em indivíduos talassêmicos, pode-se suspeitar da presença de alguma(s) característica(s) que torne alguns animais mais suscetíveis (SANTURIO *et al.*, 2003a). Segundo Foil (1996), *P. insidiosum* é considerado um micro-organismo patogênico, uma vez que a supressão imunológica não é um pré-requisito aparente para a infecção.

No Brasil, a pitiose foi descrita em equinos, bovinos, ovinos e caninos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em equinos. O primeiro relato ocorreu no Rio Grande do Sul por Santos & Londero (1974). Desde então, há várias descrições da doença em diferentes Estados do Brasil. O Pantanal brasileiro é provavelmente o local de maior incidência e prevalência de pitiose equina do mundo (Mendoza *et al.*, 1996). O Pantanal é uma planície inundável de aproximadamente 140.000 km² e possui em torno de 139.760 equinos (Silva *et al.*, 1995). Embora não exista um levantamento preciso da incidência no Brasil, a pitiose representa um problema à equinocultura, especialmente em regiões alagadiças como o Pantanal (Leal *et al.*, 2001b).

Não foi observada predisposição de raça, sexo ou idade nos equinos com pitiose (MENDOZA & ALFARO, 1986; CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996). 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 contendo zoósporos (MILLER & CAMPBELL, 1982a; CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDONZA *et al.*, 1996).

Os sinais clínicos em equinos 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 de *kunkers* (PEREIRA, 2008). Essas massas variam de 2 a 10 mm de diâmetro, com forma irregular, ramificada, aspecto arenoso e penetram no tecido granular, dentro de “sinus” formados ao longo do seu trajeto. O tamanho das lesões depende da sua localização e tempo de evolução da infecção, podendo apresentar secreção serosanguinolenta, mucosanguinolenta, hemorrágica e, às vezes, mucopurulenta que flui através dos “sinus”. Os animais apresentam intenso prurido e usualmente mutilam a lesão na tentativa de aliviar o desconforto. Claudicação é frequente nos cavalos atingidos nos membros (MILLER & CAMPBELL, 1982a; MEIRELES *et al.*, 1993; CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDOZA *et al.*, 1996). A maioria dos casos descritos relata apenas uma lesão em cada animal, porém podem existir lesões cutâneas multifocais, como as descritas por Miller & Campbell (1982a), Mendoza & Alfaro (1986) e Chaffin *et al.* (1992).

A segunda forma mais frequente da infecção pelo *P. insidiosum* em equinos é a intestinal. Os casos descritos apresentaram-se como episódios de cólica, cuja causa foi a presença de massas teciduais, com diminuição e/ou obstrução do lúmen intestinal. Além da pitiose cutânea e intestinal, pitiose pulmonar foi relatada por Pecquet-Goad (1984) em um equino que apresentava tosse e descarga nasal sanguinolenta um ano após tratamento de uma lesão cutânea em um dos membros, e Reis *et al.* (2003), detectaram infecção generalizada em três equinos no estado de Minas Gerais, com lesões localizadas principalmente nos pulmões e fígado.

Os autores sugeriram que a disseminação do patógeno para órgãos internos seria possível em casos crônicos de pitiose. As lesões ósseas descritas na literatura referem-se a cavalos com lesões cutâneas crônicas localizadas nos membros e com grande proliferação de tecido granulomatoso. Lesões em linfonodos cervicais inferiores, inguinais e submandibulares, normalmente os responsáveis pela drenagem linfática da região afetada pela lesão cutânea, foram observadas por Connole (1973); Murray *et al.* (1978) e Leal *et al.* (1997).

A histopatologia da pele de equinos afetados revela a presença de úlceras acompanhadas por acantose, paraqueratose e papilomatose, podendo constituir-se numa hiperplasia pseudoepiteliomatosa, enquanto a derme apresenta abundantes áreas necróticas (microabscessos), com reação inflamatória composta basicamente de eosinófilos, células plasmáticas, neutrófilos, alguns linfócitos e macrófagos (MENDONZA, 1987). Segundo Miller & Campbell (1984), as lesões histológicas caracterizam-se pela formação de coágulos eosinofílicos encontrados no interior de tecido fibroso e inflamação granulomatosa. Os *kunkers*, observados na

macroscopia, correspondem aos coágulos eosinofílicos que são compostos de hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, especialmente eosinófilos. Em torno das hifas, os eosinófilos encontram-se degenerados e enquanto que, em direção a periferia os grânulos tornam-se mais evidentes, sendo comum encontrar-se eosinófilos intactos na periferia da lesão. A área ao redor do coágulo é composta por um espesso exsudato inflamatório composto de neutrófilos e eosinófilos, podendo apresentar ocasionalmente células gigantes e macrófagos. Já a área entre os *kunkers* é caracterizada por inflamação granulomatosa e granulocítica. Em lesões crônicas observa-se marcada fibrose com redução do número de células inflamatórias. A formação de depósitos eosinofílicos em torno das hifas, produzindo o fenômeno de Splendori-Hoepli, também pode ser observada (PEREIRA *et al.*, 2008). Hifas de *Pythium* spp. não coram bem em colorações de Hematoxilina e Eosina, sendo observadas como imagens negativas delimitadas por ampla bainha eosinofílica associada à parede da hifa (PEREIRA, 2008). Entretanto, em cortes corados com coloração especial de prata (Grocott), as hifas são evidenciadas na periferia dos *kunkers* com paredes espessas marrom-escuras, esparsamente septadas, irregularmente ramificadas (normalmente em ângulo reto) e medindo de 2 a 6 μm de diâmetro (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996).

Em bovinos, a pitiose foi descrita na região da Louisiana (EUA) afetando seis animais (MILLER *et al.*, 1985), na região do Pantanal Matogrossense (Brasil) em dois bovinos (SANTURIO *et al.*, 1998) e na Venezuela, onde se observou a ocorrência de pitiose enzoótica em 63 bovinos (PÉREZ *et al.*, 2005). Em todos os casos havia a presença de lesões cutâneas, geralmente localizadas nos membros,

caracterizadas por ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada. Prurido e claudicação foram observados nos casos descritos por Pérez *et al.* (2005). Em nenhum dos relatos observou-se presença de *kunkers* e a idade dos animais afetados variou entre três meses e um ano de idade. Histologicamente, as lesões apresentaram-se como granulomas dermais multifocais, rodeados por tecido conjuntivo fibroso e presença de hifas ramificadas no centro dos granulomas. A reação de Splendore-Hoeppli foi observada nos casos descritos por Miller *et al.* (1985) e Pérez *et al.* (2005). Apenas o relato de Santurio *et al.* (1998) mencionou a cura espontânea das lesões.

Nos ovinos a primeira descrição de pitiose foi relatada por Tabosa *et al.* (2004) afetando dois rebanhos no nordeste brasileiro, no estado da Paraíba. Os animais afetados apresentaram lesões ulcerativas úmidas ou secas, localizadas nos membros, regiões abdominal e pré-escapular, sem presença de *kunkers*. *P. insidiosum* foi isolado das lesões cutâneas e o diagnóstico foi confirmado por imunohistoquímica. O segundo relato de pitiose em ovinos também foi reportado no Brasil, sendo o primeiro caso de rinite granulomatosa por *P. insidiosum* descrito nesta espécie (SANTURIO *et al.*, 2008). A enfermidade ocorreu em quatro ovinos da raça Santa Inês e foi caracterizada por nodulações e necrose nasal, dispnéia e epistaxe intermitente (SANTURIO *et al.*, 2008).

No Brasil, o primeiro caso de pitiose canina foi descrito em uma fêmea com lesão cutânea no membro posterior direito (LARSSON *et al.*, 1997). Posteriormente, dois casos de pitiose gastrointestinal foram descritos no Rio Grande do Sul por Riet-Correa *et al.* (1998) e Rech *et al.* (2004). Os caninos são a segunda espécie mais

atingida pela pitiose, também nas formas cutânea e gastrointestinal. A forma gastrointestinal é a mais comum e manifesta-se com distúrbios digestivos como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarréia e presença de massas nodulares à palpação abdominal (MILLER *et al.*, 1983; MILLER, 1985; BENTINCK-SMITH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; RIET-CORREA *et al.*, 1998; HELMAN & OLIVER, 1999; LILJEBJELKE *et al.*, 2002; GROOTERS, 2003, MENDONZA *et al.*, 2005). Os cães afetados são normalmente oriundos de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados como açudes e banhados (FOIL *et al.*, 1984; FISCHER *et al.*, 1994; HELMAN & OLIVER, 1999; DYKSTRA *et al.*, 1999).

As lesões gastrointestinais caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino com ulceração variável da mucosa (MILLER *et al.*, 1983; MILLER, 1985; BENTINCK-SMITH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; LILJEBJELKE *et al.*, 2002; RECH *et al.*, 2004). Miller (1985) descreveu que em lesões crônicas, o pâncreas, útero, linfonodos mesentéricos e vasos linfáticos também podem ser afetados. Histologicamente, as lesões localizam-se preferencialmente na mucosa e submucosa, sendo compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, intenso infiltrado eosinofílico e presença de hifas nos focos necróticos (MILLER *et al.*, 1983; MILLER, 1985; BENTINCK-SMITH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; LILJEBJELKE *et al.*, 2002; RECH *et al.*, 2004, MENDONZA *et al.*, 2005), podendo em algumas ocasiões observar a reação de Splendori-Hoeppli (FISCHER *et al.*, 1994). As lesões cutâneas geralmente se localizam nas extremidades, base da cauda, períneo e face, aumentam rapidamente de tamanho, ulceram e apresentam múltiplos tratos

fistulosos (THOMAS & LEWIS, 1998). Microscopicamente, as lesões apresentam-se como dermatite granulomatosa a piogranulomatosa ulcerativa, contendo áreas de necrose infiltrada por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos (FOIL *et al.*, 1984; ENGLISH & FROST, 1984; HOWERTH *et al.*, 1989; DYKSTRA *et al.*, 1999).

Em felinos há poucas descrições. Um relato refere-se a uma infecção nasal e retrobulbar, sem envolvimento de órgãos internos, cujo diagnóstico baseou-se em imunohistoquímica, sorologia (imunodifusão) e isolamento do agente. A histopatologia revelou o acúmulo de eosinófilos, macrófagos, grandes linfócitos e presença de hifas largas e ramificadas (BISSONNETTE *et al.*, 1991). Thomas & Lewis (1998) relataram quatro casos de pitiose cutânea com lesões nos membros, abdômen e região inguinal. Estes mesmos autores descreveram lesões com manifestações clínicas diferentes em dois gatos, caracterizadas por grandes massas subcutâneas na região distal dos membros, sem envolvimento cutâneo. Grooters (2003) observou, desde 1999, a ocorrência de dez casos de pitiose subcutânea afetando gatos entre quatro meses e nove anos de idade. As lesões caracterizavam-se por massas subcutâneas, algumas altamente invasivas, localizadas na região inguinal, base da cauda e região periorbital. Em alguns casos, as lesões eram nodulares e supurativas e em outros se assemelhavam a placas ulceradas localizadas nas extremidades. Rakich *et al.* (2005) relataram dois casos de pitiose gastrointestinal em gatos nos EUA. Os animais apresentavam perda de peso e vômito, associados a uma massa palpável na região abdominal. A avaliação histopatológica revelou uma enterite granulomatosa eosinofílica, envolvendo a

camada muscular e serosa, com áreas multifocais de necrose, no interior das quais havia a presença de hifas de *P. insidiosum*.

No homem existem quatro diferentes formas clínicas de pitiose: vascular, ocular, cutânea / subcutânea e formas diversas, correspondendo por 59, 33, 5, e 3% de todos os casos, respectivamente (SUDJARITRUK & SIRISANTHANA, 2011). A forma cutânea caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões subcutâneas com achados histopatológicos de reação granulomatosa, infiltração difusa e edema da parede dos vasos. Já a forma vascular, é caracterizada pelo desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores. Esta forma é encontrada em pacientes talassêmicos e geralmente leva a amputação do membro afetado (PEREIRA, 2008). A forma ocular manifesta-se como ceratite, podendo ou não estar associada a talassemia. Nesta forma, os pacientes usualmente terminam por realizar ceratoplastia, evisceração ou enucleação (IMWIDTHAYA, 1995; PRASERTWITAYAKIJ *et al.*, 2003). Nestes casos, tanto o diagnóstico precoce, como o adequado tratamento médico e cirúrgico são cruciais para um bom prognóstico (SUDJARITRUK & SIRISANTHANA, 2011).

Os primeiros casos de pitiose humana foram relatados na Tailândia (MENDOZA *et al.*, 1996), sendo o país com o maior número de casos descritos. Prasertwitayakij *et al.* (2003) realizaram uma revisão na literatura, e encontraram 32 casos de pitiose humana, sendo 25 relatados na Tailândia e os demais nos EUA, Austrália, Haiti, Malásia e Nova Zelândia. Na maioria dos casos descritos os pacientes eram agricultores e apresentavam talassemia. Nove pacientes desenvolveram a forma de ceratite com ulceração da córnea, sendo realizada

ceratoplastia em todos os afetados. Cinco apresentaram a forma subcutânea e foram submetidos à excisão cirúrgica da lesão e tratamento com antifúngicos, respondendo bem a terapia. Dezesete pacientes tailandeses desenvolveram a forma sistêmica, dos quais 16 sofreram amputação do membro afetado e oito vieram a óbito. Na Tailândia, observa-se que dois fatores contribuem para importância da pitiose humana: a prevalência da α e β talassemia e presença de grandes áreas alagadiças utilizadas para agricultura (TRISCOTT *et al.*, 1993; IMWIDTHAYA, 1994b). Além dos casos de ceratite incluídos na revisão de Prasertwitayakij *et al.* (2003), outros relatos foram descritos na Tailândia por Imwidthaya (1995) e Krajaejun *et al.* (2004). Nos EUA, Shenep *et al.* (1998) relataram a ocorrência de ceratite causada por *P. insidiosum* em uma criança, que obteve cura após tratamento com antifúngicos. No Brasil a pitiose teve seu primeiro relato em humanos no ano de 2005, na forma cutânea (BOSCO *et al.*, 2005).

Até o presente momento, não foi possível reproduzir-se a enfermidade através de infecção experimental nas espécies infectadas naturalmente. Miller & Campbell (1983a) demonstraram a suscetibilidade de coelhos como modelo experimental para a pitiose. A inoculação subcutânea de água rica em zoósporos produziu nódulos que evoluíram para fibrogranulomas eosinofílicos com características similares à infecção natural dos equinos, havendo o isolamento de *P. insidiosum* de algumas lesões. Após 20-30 dias de inoculação subcutânea dos zoósporos observaram abscedação progressiva, porém não ocorreram ulcerações comparáveis com a doença natural nos equinos, e tampouco a formação de *kunkers* (MILLER & CAMPBELL, 1983a). No entanto, na avaliação leucocitária, o

quadro da pitiose em coelhos foi semelhante aos equinos, ou seja, ocorreu progressiva leucocitose com moderada neutrofilia e leve monocitose (MILLER & CAMPBELL, 1983a,b). A histologia das lesões revelou uma área central de necrose contendo eosinófilos e hifas fúngicas na periferia, delimitada por tecido conjuntivo, o qual se encontrava envolvido externamente por uma bainha assimétrica de macrófagos, células epitelióides e algumas células gigantes (MILLER & CAMPBELL, 1983a). Os trabalhos de alguns pesquisadores como Santurio *et al.* (2003b), que utilizaram coelhos inoculados com *P. insidiosum* para avaliar três diferentes formulações usadas para imunoterapia, Leal *et al.* (2002), que avaliaram a resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *P. insidiosum*, e Pereira *et al.* (2008), que comparam a terapia antifúngica e a imunoterapia, comprovam que esta espécie serve como modelo experimental, tanto para estudos sorológicos como para avaliação de agentes antifúngicos contra *P. insidiosum*. Em resumo, a pitiose experimental é possível apenas em coelhos (GAASTRA *et al.*, 2010).

O diagnóstico presuntivo de pitiose é realizado levando-se em consideração a epidemiologia, sinais clínicos e aspectos macro e microscópicos das lesões. O isolamento e identificação do agente são de grande valor para o diagnóstico definitivo e diferencial, uma vez que a pitiose em equinos deve ser diferenciada de habronemíase cutânea, zigomicoses (especialmente conidiobolomicose e basidiobolomicose), neoplasias, como carcinoma de células escamosas e sarcóide, tecido de granulação exuberante e granulomas bacterianos (CHAFFIN *et al.*, 1995). Já em caninos, o diagnóstico diferencial deve incluir infecções causadas por zigomicetos e oomicetos do gênero *Lagenidium* (GROOTERS,

2003).

Embora o isolamento e identificação de *P. insidiosum* constituam uma importante ferramenta para o diagnóstico, em algumas ocasiões o isolamento não ocorre e a identificação das espécies de *Pythium* não é uma tarefa fácil, pois baseia-se principalmente nas características morfológicas dos zoosporângios, zoósporos, oogônia e anterídio (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; MOORE-LANDECKER, 1996). O isolamento pode ser feito nos meios de cultivo como ágar Sabouraud dextrose, caldo Sabouraud, ágar sangue, ágar infusão-cérebro-coração (BHI) e ágar farinha de milho (CMA) (CHAFFIN *et al.*, 1995). Pedacos pequenos de tecido fresco, previamente lavados em solução salina ou água destilada estéril, são distribuídos diretamente na superfície do ágar, devendo ficar incubado a 37°C, por 24 – 48 horas (MENDONZA *et al.*, 1996). A identificação é realizada através do aspecto da colônia e da característica das hifas. As colônias apresentam-se submersas no ágar, com curto micélio aéreo, apresentando coloração hialina. Microscopicamente, observam-se hifas hialinas, cenocíticas com 4-10 µm de diâmetro, ocasionalmente septadas, apresentando ramificações em ângulo reto (DE COCK *et al.*, 1987). A produção de zoosporângios e zoósporos deve ser observada para identificação final de *P. insidiosum*. Para obtenção de zoósporos *in vitro*, pedacos de folhas de grama previamente esterilizados, são distribuídos sobre cultivos de *P. insidiosum* em ágar água a 2% e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, os pedacos de folhas infectados são transferidos para uma solução de sais minerais diluída a 1%. Cerca de 2-4 horas de incubação a 37°C, zoosporângios contendo zoósporos móveis são observados

nos bordos terminais das folhas (MENDONZA & PRENDAS, 1988; CHAIPRASERT *et al.*, 1990; GROOTERS, 2003). Os zoósporos tem forma reniforme e apresentam um flagelo anterior (que gera o impulso) e um flagelo posterior (responsável pela direção) originados de um sulco ventral ou lateral. Uma vez liberados das vesículas, nadam em movimentos espirais ou helicoidais em diferentes direções, por aproximadamente quinze minutos. Após esse período, se encistam tornando-se globosos e emitem tubo germinativo (MENDONZA *et al.*, 1993; GROOTERS, 2003).

Técnicas sorológicas foram desenvolvidas para o diagnóstico precoce e monitoramento da resposta imunológica em equinos com pitiose. Miller & Campbell (1982b) desenvolveram as técnicas de imunodifusão em gel de ágar (ID), fixação do complemento (FC) e um teste de hipersensibilidade intradérmica (TI), para diagnosticar e avaliar a resposta imune humoral e celular de cavalos com pitiose. Os testes realizados em cavalos com pitiose clínica comprovada, diagnosticaram positivamente 100% (ID), 82% (FC) e 64% (TI) dos casos. Esses dados comprovaram que o teste de ID apresentava alta sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos anti-*P. insidiosum*. Resultados similares foram obtidos por Mendonza & Alfaro (1986). Mendonza *et al.* (1986) avaliando três diferentes antígenos utilizados para o teste de ID, demonstraram melhor sensibilidade e especificidade quando o antígeno foi produzido a partir de filtrados de cultura. O teste de FC foi utilizado somente na Austrália, pois além da menor sensibilidade e especificidade que a ID, é um teste difícil de realizar e requer pessoal experiente para seu desenvolvimento (MENDOZA *et al.*, 1996). Da

mesma forma, Imwidthaya & Srimuang (1989) demonstraram a sensibilidade e especificidade da ID para o diagnóstico e monitoramento da pitiose no homem. Embora este teste identifique anticorpos no soro da maioria dos equinos e humanos infectados, falha na detecção de anticorpos em caninos com doença ativa (GROOTERS, 2003). Similarmente, Pérez *et al.* (2005) ao utilizar o teste de ID para diagnóstico de pitiose em bovinos, constataram que apenas 22,8% dos animais infectados demonstraram reações positivas, sugerindo a baixa sensibilidade desta técnica para o diagnóstico da doença nesta espécie.

Segundo Mendonza *et al.* (2005), um importante passo para identificação de *P. insidiosum* em amostras histopatológicas foi o desenvolvimento das técnicas de anticorpos fluorescentes por Mendonza *et al.* (1987) e imunoperoxidase por Brown & Roberts (1988). O teste de imunofluorescência demonstrou especificidade na detecção de hifas nos tecidos de felinos, caninos e humanos, porém em equinos, a fluorescência uniforme observada, devido à liberação de antígenos solúveis, impediu a utilização deste teste como diagnóstico nesta espécie (MENDONZA *et al.*, 1996).

Alguns autores citaram que a técnica de imunoperoxidase tem sido utilizada no diagnóstico de pitiose em equinos, caninos, bovinos, ovinos e humanos (BROWN & ROBERTS, 1988; HOWERTH *et al.*, 1989; TRISCOTT *et al.*, 1993; FISCHER *et al.*, 1994; PURCELL *et al.*, 1994; HELMAN & OLIVER, 1999; SANTURIO *et al.*, 1998; LILJEBJELKE *et al.*, 2002; JAEGER *et al.*, 2002; TABOSA *et al.*, 2004). Entretanto, Grooters *et al.* (2003) mostraram reação cruzada em caninos infectados por *Lagenidium* sp.

Mendoza *et al.* (1997) desenvolveram um teste de ELISA para o sorodiagnóstico de pitiose em humanos e animais, utilizando antígeno solúvel de hifas sonicadas. Amostras de soro de humanos e animais saudáveis e com pitiose clínica foram testadas e os resultados comparados com o teste de ID. Os dados deste trabalho demonstraram que o teste de ELISA foi eficiente para o diagnóstico da pitiose, apresentando especificidade semelhante à ID, todavia com melhor sensibilidade. No Brasil, o desenvolvimento de um teste de ELISA para diagnóstico de pitiose equina por Rosa *et al.* (1999) e de uma técnica de “ELISA-conta” para detecção da soropositividade de equinos por Alves *et al.* (2001) também apresentaram bons resultados. Já Pinto *et al.* (1999) descreveram a padronização do teste de ELISA para detecção de IgG em coelhos imunizados com antígenos de *P. insidiosum*. Testes de ELISA para diagnóstico sorológico precoce de pitiose em caninos, humanos e bovinos também foram desenvolvidos (GROOTERS *et al.*, 2002; KRAJAEJUM *et al.*, 2002, PÉREZ *et al.*, 2005), demonstrando alta sensibilidade e especificidade nestas espécies. Este teste também tem sido utilizado no diagnóstico da doença em felinos. Além de constituir-se numa poderosa ferramenta para o diagnóstico específico, também pode ser útil no monitoramento da resposta a terapia (GROOTERS, 2003).

O teste de Western Blot desenvolvido por Mendonza *et al.* (1992b) foi introduzido com o objetivo de identificar antígenos imunodominantes de *P. insidiosum* durante a infecção. Esta técnica mostrou boa especificidade, sendo útil na identificação dos isótipos de imunoglobulinas em animais com doença ativa (MENDONZA *et al.*, 1996). A utilização deste teste na pitiose bovina identificou 100% dos animais infectados (PÉREZ *et al.*, 2005). Lübeck *et al.* (1999)

desenvolveram um teste de dot-blot modificado para detecção de IgG anti-*Pythium* em coelhos e equinos. A técnica desenvolvida utilizou sistema de luminescência química para visualização da reação, no entanto, esta metodologia pode ser adaptada para um sistema de visualização direta em membrana, podendo ser utilizada como um teste de campo, apresentando especificidade, sensibilidade, praticidade e baixo custo.

O desenvolvimento de técnicas moleculares constitui atualmente importante ferramenta para o diagnóstico, identificação e estudos filogenéticos de *P. insidiosum*. Neste contexto, vários pesquisadores tem demonstrado que o seqüenciamento gênico com amplificação do RNA ribossomal, região ITS 1, através de PCR (reação de polimerase em cadeia) (GROOTERS & GEE, 2002; VANITTANAKOM *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2006, BOTTON *et al.*, 2011) e utilização de sondas genéticas (SCHURKO *et al.*, 2004), constituem-se em técnicas para a identificação rápida e definitiva de *P. insidiosum*.

O *P. insidiosum* difere dos fungos verdadeiros na produção de zoósporos móveis e na composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto o *Pythium* contém celulose e β -glucanas. A membrana plasmática não contém esteróides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Devido a essas características, não existe droga antifúngica eficiente contra o *P. insidiosum* (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989; FOIL, 1996). Os fitopatógenos do gênero *Pythium* são sensíveis aos inseticidas normalmente utilizados em plantas, porém esses compostos são tóxicos aos mamíferos,

impossibilitando seu uso para o tratamento da pitiose (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989). Um fungicida utilizado em plantas (Metalaxil) foi testado no tratamento de cães, porém com resultados pouco consistentes, em parte pela toxicidade do composto (FOIL, 1996).

O sucesso das diferentes formas de tratamento é variável e em muitos casos influenciado pelo tamanho e tempo da lesão, idade e estado nutricional do animal (SANTURIO *et al.*, 2006). O tratamento tradicional da pitiose equina era cirúrgico, sendo o procedimento mais utilizado (MILLER, 1981); no entanto a intervenção cirúrgica é complicada devido às estruturas anatômicas envolvidas, pois a partir da permanência de fragmentos do agente podem ocorrer recidivas (MILLER, 1981; CHAFFIN *et al.*, 1995). O tratamento cirúrgico apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais, onde seja possível a retirada de toda área afetada (SANTURIO *et al.*, 2006).

No decorrer da década de 80 e 90 vários autores utilizaram a imunoterapia, cada um com suas modificações na técnica originalmente descrita. Em 1986, Mendoza & Alfaro utilizaram como antígeno apenas o sobrenadante das culturas, objetivando diminuir a reação no local de aplicação. Nesta ocasião, foram utilizados cinco animais para o teste, dos quais três foram recuperados. Mendoza *et al.* (1992a), compararam duas vacinas para tratamento da pitiose equina em 71 cavalos infectados. Para uma vacina foi utilizada uma massa celular como antígeno, e na outra um antígeno solúvel concentrado. As duas vacinas apresentaram resultados positivos em cavalos com lesões com menos de dois meses de evolução, com 60% e 70% de eficiência, respectivamente.

No Brasil, o teste de eficiência de um imunobiológico (Pitium Vac®) para o tratamento da pitiose equina, produzido a partir de culturas do *P. insidiosum* e baseado na metodologia anteriormente descrita por Miller (1981), demonstrou índice de cura que variou de 50% a 83,3% entre os grupos tratados, independente do tempo de evolução clínica da lesão, característica ainda não observada com os outros imunoterápicos testados (MONTEIRO,1999). Santurio *et al.* (2003b), utilizando coelhos como modelo experimental, avaliaram a eficiência de três processos de produção de imunoterápicos contra pitiose, produzidos a partir de cultivos e submetidos aos processos de maceração e sonicação. Observaram que o imunoterápico produzido por maceração foi superior, reduzindo em até 72% a área dos nódulos cutâneos. Os resultados deste trabalho sugerem que a sonicação pode ocasionar a desnaturação dos antígenos protetores, reduzindo desta forma, a eficácia da imunoterapia.

Mendonza *et al.* (2003), testaram uma nova formulação de vacina para *P. insidiosum* em 18 equinos e 6 caninos. Esta nova formulação contendo uma mistura de exoantígenos e antígenos citoplasmáticos curou 72% dos equinos e 33% dos caninos, sugerindo que a inclusão dos antígenos citoplasmáticos aumenta as propriedades curativas do imunoterápico. Além disso, Leal *et al.* (2002), demonstraram que os imunoterápicos em uso podem ter sua atuação prolongada e potencializada quando utilizados com adjuvantes.

Resultados animadores da imunoterapia em humanos foram observados por Thitithanyanont *et al.* (1998). Após insucesso com tratamentos a base de anfotericina B, iodetos, cetoconazol e cirurgia em um menino talassêmico com

pitiose, o uso do imunoterápico induziu a cura após duas aplicações, com intervalo de 14 dias. Wanachiwanawin *et al.* (2004) utilizando o imunoterápico previamente descrito, observaram que este método curou quatro de oito casos de pitiose arterial terminal em humanos na Tailândia.

Apesar dos estudos sobre a doença e a imunoterapia, ainda não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção por *P. insidiosum*. De acordo com Miller (1981), o caráter progressivo da doença em equinos imunocompetentes sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio na mesma. Esse autor acredita que mesmo sendo antigênicas, as hifas não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro, devido à marcante reação inflamatória, particularmente eosinofílica. Acredita-se que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia baseiem-se principalmente na resposta celular (THITITHANYANONT *et al.*, 1998; MENDONZA *et al.*, 2003; WANANACHIWANAWIN *et al.*, 2004), devido uma mudança da resposta mediada pela subpopulação de linfócitos Th2 para uma resposta mediada pela subpopulação de linfócitos Th1. Possivelmente, os antígenos presentes no imunógeno induzam esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais (MENDONZA *et al.*, 1996). Já a resposta humoral foi observada por Newton & Ross (1993) ao verificarem que o nível de anticorpos anti-*Pythium* aumenta em equinos doentes submetidos à imunoterapia.

No tratamento químico da pitiose equina, os fármacos mais utilizados foram a anfotericina B e os compostos iodínicos, como iodeto de potássio e sódio (McMULLAN *et al.*, 1977; GONZALES *et al.*, 1979; ALLISON & GILLIS, 1990;

MEIRELES *et al.*, 1993). McMullan *et al.* (1977) obtiveram 50% de eficiência associando a remoção cirúrgica e anfotericina B; 30% apenas com anfotericina B e 20% não responderam aos tratamentos. Little & Kabay (1984) e Chaffin *et al.* (1992) relataram o sucesso do tratamento cirúrgico seguido de iodeto de sódio em potros com pitiose cutânea. Entretanto, Meireles *et al.* (1993) não obtiveram sucesso em dois equinos tratados com iodeto de potássio endovenoso, até mesmo quando associado à cirurgia. Utilizando outras tentativas de tratamento, Sedrish *et al.* (1997) obtiveram sucesso no uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio como terapia suplementar após a remoção cirúrgica de lesões de pitiose equina. Porém, alguns autores afirmam que a ressecção cirúrgica total do granuloma combinada com imunoterapia específica para *P. insidiosum* seria o tratamento mais indicado para cura de pitiose em equinos (HUBERT & GROOTERS, 2002).

Até o presente momento, nenhuma das terapias antifúngicas propostas para a pitiose canina apresentaram resultados satisfatórios. Entre as drogas testadas destacam-se a anfotericina, fluconazol, cetoconazol e itraconazol (FOIL *et al.*, 1984; ENGLISH & FROST, 1984; DYKSTRA *et al.*, 1999, JAEGER *et al.*, 2002; RIVIERRE *et al.*, 2005). Segundo alguns autores, a cirurgia continua como opção mais segura para o tratamento da pitiose canina (HNILICA, 1998, THOMAS & LEWIS, 1998; GROOTERS, 2003). Entretanto, Grooters (2003) cita que as recidivas pós-operatórias são frequentes. Este mesmo autor relata que aproximadamente 15% dos cães com pitiose gastrointestinal responderam ao tratamento com itraconazol ou anfotericina B lipídica. Também observou melhora ou cura clínica e sorológica em alguns casos de pitiose cutânea canina e felina tratados com a associação antifúngica terbinafina-itraconazol. Afirma que, embora o número de animais que

responderam a este protocolo de tratamento tenha sido baixo, a combinação antifúngica pareceu superior à terapia isolada.

O tratamento da pitiose felina também apresenta resultados variados. Bissonnette *et al.* (1991) realizaram o tratamento de um felino com pitiose nasal e retrobulbar com cetoconazol, e observaram que houve melhora clínica, porém a lesão recidivou após o término do tratamento. Já Rakich *et al.* (2005) obtiveram resultados diferentes ao tratar dois felinos com pitiose gastrointestinal. O animal tratado com a associação terbinafina/itraconazol, durante dois meses após retirada cirúrgica da lesão, apresentou cura clínica sem recidivas. Porém, morreu subitamente quatro meses após a cirurgia. O outro felino, que recebeu terapia com itraconazol, também por dois meses após retirada cirúrgica da lesão, demonstrou sorologia negativa, detectada por meio de um teste de ELISA, realizado cinco meses após tratamento. Este animal permaneceu em observação por nove meses, não apresentando recidiva da lesão durante esse período.

A tendência ao tratamento da pitiose atualmente está voltada para os chamados inibidores de síntese de glucanas, como a caspofungina (KRAJAEJUN *et al.*, 2006). Acredita-se que esta droga seja eficiente contra este agente devido a grande quantidade de β -glucana presente na parede celular deste oomiceto (GROOTERS, 2003). Alguns estudos demonstraram a suscetibilidade de *P. insidiosum* à caspofungina determinando a concentração inibitória mínima desta droga (PEREIRA *et al.* 2007, BROWN *et al.*, 2008). Pereira *et al.* (2007) avaliaram a suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados de *P. insidiosum* frente à caspofungina e ainda relacionaram estes achados com a resposta da terapia *in vivo* em coelhos com pitiose experimental. Entretanto, este estudo sugeriu que *P. insidiosum* é

pouco suscetível à caspofungina *in vitro* e *in vivo*. Alguns autores relataram que o crescimento paradoxal de isolados de *C. albicans* pode ocorrer em concentrações elevadas de caspofungina, e este fenômeno tem sido registrado com diversas espécies de *Candida* (STEVENS *et al.*, 2004;. PERLIN, 2007). Além disso, o crescimento paradoxal também foi descrito em espécies de *Aspergillus* (SÓCZÓ *et al.*, 2007).

De forma similar aos resultados clínicos, os testes de sensibilidade *in vitro* com antifúngicos, realizados com *P. insidiosum*, também tem demonstrado resultados contraditórios. Em um estudo de Sekhon *et al.* (1992) os poliênicos (anfotericina B, hamycin e seus análogos) não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azólicos (fluconazol, cetoconazol e miconazol) inibiram os isolados de *P. insidiosum* testados *in vitro*, com o miconazol apresentando os melhores resultados, seguido do cetoconazol. Entretanto, Triscott *et al.* (1993), relatando pitiose subcutânea na região periorbital de dois jovens, constataram a boa resposta ao tratamento com anfotericina B, contrariando os resultados obtidos nos testes de sensibilidade. Em outro estudo, as drogas anfotericina B, flucitosina, miconazol e griseofulvina não inibiram o crescimento do fungo, enquanto o itraconazol apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *P. insidiosum* testado (SHENEP *et al.*, 1998).

As indicações para a utilização dos diferentes antifúngicos devem ser baseadas nos resultados obtidos com os estudos de suscetibilidade disponíveis, os quais podem oferecer informações para escolha do tratamento mais adequado (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002). Os padrões do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) constituem os métodos de referência

mais difundidos e os que mais se tem utilizado para realizar estudos de correlação com a clínica (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002). O documento M 38-A2 é um dos métodos de referência do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, formalmente National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS). M 38-A2 é uma norma global desenvolvida, mediante processo consensual do CLSI, para testes de diluição em caldo com a finalidade de determinar a suscetibilidade *in vitro* de fungos filamentosos à terapia antifúngica (CLSI, 2008). Este documento apresenta a seleção de agentes antifúngicos; preparação de soluções antifúngicas padrão e diluições para a realização de testes; e os requisitos de controle de qualidade para testes de sensibilidade de fungos filamentosos que causam infecções fúngicas invasivas.

Os resultados positivos obtidos com terapias utilizando terbinafina e itraconazol são inesperados, uma vez que estes antifúngicos atuam na síntese do ergosterol. O itraconazol é um triazólico que apresenta atividade antifúngica contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e dermatófitos. O seu mecanismo de ação consiste na inibição da lanosina 14 α -desmetilase, um sistema de enzimas microssômicas dependentes do citocromo P-450, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. Por isso, comprometem a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levam ao acúmulo de 14 α metilesteróis, os quais podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolipídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados a membrana, como ATPase e as enzimas de transporte de elétrons, inibindo assim, o crescimento dos fungos. O itraconazol é

administrado por via oral e, após absorção, sofre extenso metabolismo hepático. É altamente lipossolúvel, com meia vida de 36 horas, sendo excretado na urina (BENNET, 2003).

A terbinafina é um antifúngico oral ou tópico usado para tratar dermatofitose, e tem sido avaliado também em combinações com outros agentes (VAZQUEZ, 2003). Terbinafina é um composto fungicida queratinofílico, altamente lipofílico, pertencente ao grupo das alilaminas (COSTA & GÓRNIK, 2002). É altamente efetiva contra dermatófitos *in vitro* e *in vivo* (DAVIS & BALFOUR, 1995; GHANNOUM & RICE, 1999), bem como contra fungos filamentosos, dimórficos e dematiáceos, e algumas espécies de leveduras (BALFOUR & FAULDS, 1992). Atua especificamente em uma etapa precoce da biossíntese do ergosterol (GHANNOUM *et al.*, 1999), inibindo a enzima esqualeno-epoxidase, levando a deficiência de esterol na membrana celular fúngica e acúmulo intracelular tóxico de esqualeno (N'DIAYE *et al.*, 2006), resultando em morte celular. Também é metabolizada no fígado pelo sistema citocromo P-450 e os metabólitos são excretados na urina (BENNET, 2003). Tem sido usada contra dermatófitos, mas estudos indicaram uma atividade elevada de terbinafina *in vitro* contra uma grande variedade de fungos invasivos, tais como espécies de *Candida*, espécies de *Aspergillus* ou *Penicillium marneffeii* (RYDER *et al.*, 1998; MOORE *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de inibidores da β (1,3)-D-glucana sintetase, envolvida na síntese da glucana da parede celular fúngica, representa um importante avanço na quimioterapia antifúngica. A caspofungina é um lipopeptídeo anfipático solúvel em água (DERESINSKI & STEVENS, 2003). O seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da síntese de β (1,3)-D-glucana da parede celular fúngica por inibição não

competitiva da enzima $\beta(1,3)$ -D-glucana sintetase, a qual é indispensável para síntese da parede fúngica (MASCHMEYER & GLASMACHER, 2005; DATRY & BART-DELABESSE, 2006). As cadeias de $\beta(1,3)$ -D-glucana formam uma sólida matriz tridimensional, constituindo-se no maior componente da parede fúngica que promove integridade estrutural e estabilidade osmótica na maioria dos fungos patogênicos (GONZÁLEZ *et al.*, 2001; LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). A inibição da síntese de $\beta(1,3)$ -D-glucana produz um duplo efeito, fungistático e fungicida. O efeito fungistático resulta do bloqueio da síntese da parede celular, reduzindo assim o crescimento fúngico. Já o efeito fungicida, resulta de uma mudança na integridade da parede celular, a qual perde sua resistência mecânica tornando-se incapaz de resistir à pressão osmótica interna, cujo resultado é a destruição da célula fúngica (LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). Como esta enzima não existe nas células dos mamíferos, este modo de ação é único e específico na célula fúngica, eliminando-se assim, a toxicidade para os animais e humanos (PEREIRA, 2008).

A caspofungina apresenta atividade *in vitro* contra espécies de *Candida*, incluindo amostras resistentes a anfotericina B e fluconazol; *Aspergillus* spp. e outros fungos clinicamente importantes como gêneros de *Alternaria*, *Curvularia*, *Paecilomyces variotii*, *Scedosporium apiospermum* e fungos dimórficos. Entretanto, apresenta pouca atividade contra *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporum* spp., *Rhizopus arrhizus* e *Fusarium* spp (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). Atividade fungicida tem sido observada em *Candida* spp, enquanto que estudos *in vitro* tem demonstrado efeito fungistático em *Aspergillus* spp. (LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). Em humanos, tem sido demonstrada eficácia clínica contra

infecções causadas por *Candida* e *Aspergillus*, estando a caspofungina licenciada para o tratamento de aspergilose invasiva em pacientes que são refratários ou intolerantes a outras terapias, candidemias ou outras infecções causadas por *Candida* (KARTSONIS *et al.*, 2003).

Estudos de farmacocinética tem demonstrado que caspofungina não é absorvida por via oral, devendo ser administrada em infusão endovenosa. No plasma sanguíneo encontra-se altamente ligada a proteínas plasmáticas, principalmente albumina (96%). A distribuição, e não a excreção ou a biotransformação, constitui o mecanismo predominante que influencia as depurações plasmáticas, ocorrendo pouca excreção ou biotransformação nas primeiras 30 horas após a administração. Hadju *et al.* (1997), estudando a farmacocinética da droga em camundongos, observaram que as concentrações no fígado, baço e rins foram marcadamente mais altas que as concentrações plasmáticas e Groll *et al.* (2001), avaliando o comportamento de caspofungina em coelhos, constataram que esta foi bem tolerada, atingindo concentrações plasmáticas que alcançaram ou excederam as concentrações inibitórias mínimas. As equinocandinas são degradadas lentamente no fígado por hidrólise e N-acetilação, sendo o metabolismo de ação independente do sistema enzimático citocromo P-450. Não há formação de metabólitos ativos, sendo mínima a excreção renal de droga ativa (MASCHMEYER & GLASMACHER, 2005).

Vários estudos *in vitro* tem explorado as interações entre compostos antifúngicos e outras classes de agentes antimicrobianos, demonstrando sinergismo entre agentes antifúngicos e não antifúngicos, como o ibuprofeno e a fluvastatina, contra algumas espécies fúngicas. Combinações de antifúngicos com

inibidores da bomba de prótons, antiarrítmicos, agentes redutores de colesterol, imunomoduladores, compostos antineoplásicos e antiparasitários tem sido explorados (CUENCA-ESTRELLA, 2004).

O ibuprofeno é um antiinflamatório derivado do ácido propiônico, inibindo a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2), na mesma proporção e de forma irreversível, além de também inibir a ativação e a agregação de neutrófilos, a geração de radicais livres (agindo sobre as cininas e histamina na mediação da inflamação) e a liberação de enzimas lisossomais (SPINOSA *et al.*, 2002). Possui ainda ação analgésica e antipirética. É rapidamente absorvido após administração oral e o tempo de meia-vida é de duas horas. Liga-se amplamente às proteínas plasmáticas, geralmente em proporções superiores a 90%. A via de eliminação é principalmente renal, devendo-se ter precaução quando há comprometimento da função renal. Efeitos tóxicos podem ser observados em cerca de 5 a 15% dos pacientes, compreendendo, principalmente, dor ou desconforto epigástrico, náuseas, vômitos, diarreia, sensação de plenitude gastrointestinal e constipação (SILVA, 2006).

A fluvastatina é uma estatina lipofílica e exerce seu efeito principal no fígado. É um agente redutor de colesterol, totalmente sintético, inibindo competitivamente a enzima HMG-CoA (hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA) redutase, que é responsável pela conversão da HMG-CoA em mevalonato, um precursor de esteróis, inclusive do colesterol. A inibição da biosíntese do colesterol reduz o colesterol nas células hepáticas, o que estimula a síntese dos receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e, portanto, aumenta a captação das partículas de LDL. O resultado final desses mecanismos é a redução da

concentração plasmática de colesterol (CHIN *et al*, 1997). Também, diminui a migração e proliferação das células musculares lisas na parede arterial. Evidentes alterações na resposta inflamatória têm sido relatadas com o uso das estatinas, incluindo a inibição das citocinas, proteína-C reativa, expressão das metaloproteinases da matriz e diminuição na adesão de monócitos na célula endotelial. Estudos recentes, relativos às propriedades pleiotrópicas das estatinas, têm revelado sua capacidade de inibir a síntese de importantes intermediários dos isoprenoídes, que servem como ligações para uma variedade de proteínas implicadas na sinalização intracelular. De outro lado, estudos bem conduzidos tem revelado uma diferença na potência de ação das estatinas em reduzir o colesterol e as LDL plasmáticas, discutindo-se ainda um diferencial nos seus efeitos pleiotrópicos e uma suposta seletividade tissular (JORGE *et al*, 2005).

Tendo em vista a quantidade de agentes antifúngicos sistêmicos disponíveis, uma opção para o tratamento é a terapêutica combinada. A combinação de dois medicamentos diferentes que exercem seus efeitos através de dois mecanismos diferentes, poderia evitar o aparecimento de resistência medicamentosa e ampliar o espectro da atividade da associação. Além disso, as combinações antifúngicas permitem o uso de doses mais baixas de cada composto, reduzindo o risco de efeitos tóxicos destes (ZHU *et al.*, 2004).

Segundo Johnson (2004), as vantagens dos testes de associações antifúngicas *in vitro* são: a facilidade de se avaliar grande número de concentrações; aplicabilidade de testes estatísticos; facilidade para variar fatores técnicos; facilidade para testar múltiplos isolados; facilidade para testar cepas com tipo de resistência definido. E entre as desvantagens o autor cita que a relevância

dos métodos nem sempre é clara, e que fatores do hospedeiro e a farmacocinética são ignorados.

Uma das formas mais conhecidas e mais simples para avaliar efeitos de combinações *in vitro* é através da técnica de *checkerboard*. O termo *checkerboard* se refere a um modelo, utilizando tubos ou placas de microtitulação, formado para testar dois agentes antifúngicos em várias diluições acima e abaixo da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o fungo a ser testado (CUENCA-ESTRELLA, 2004). O Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) é a forma mais comum em micologia médica para relatar resultados de estudos com o método *checkerboard*, e é a concentração mais baixa de cada fármaco capaz de inibir o crescimento do micro-organismo (CUENCA-ESTRELLA, 2004). O método *checkerboard* utiliza o ICIF para demonstrar quantitativamente que combinações de dois agentes podem apresentar efeitos inibitórios que são maiores (sinergismo) ou menores (antagonismo) que a soma dos seus efeitos individuais (ODDS, 2003). As interações são interpretadas como sinérgicas ($ICIF \leq 0,5$), indiferentes ($0,5 < ICIF \leq 4$) ou antagônicas ($ICIF > 4$) e calculadas de acordo com a fórmula: $ICIF = (CIM\ A\ em\ combinação / CIM\ A) + (CIM\ B\ em\ combinação / CIM\ B)$ (JOHNSON *et al*, 2004) ou $ICIF = (CIM\ A\ em\ combinação / CIM\ A) + (CIM\ B\ em\ combinação / CIM\ B) + (CIM\ C\ em\ combinação / CIM\ C)$ (DANNAOUI *et al*, 2004).

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1

***In vitro* paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of
caspofungin**

Artigo publicado na revista Veterinary Microbiology



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

In vitro paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of caspofungin

Juliana S. Argenta^a, Sydney H. Alves^{b,*}, Flávio Silveira^b, Grazieli Maboni^b, Daniela I.B. Pereira^b, Andreia Spanemberg^a, Janio M. Santurio^b, Laerte Ferreira^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bLaboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2009

Received in revised form 1 April 2010

Accepted 7 April 2010

Keywords:

Pythium insidiosum

Caspofungin

Paradoxical growth

ABSTRACT

Pythium insidiosum is a zoospore organism which causes pythiosis in humans and animals. This study aimed to report the paradoxical growth of Brazilian *P. insidiosum* strains when submitted to *in vitro* susceptibility tests with caspofungin. The growth at concentrations above the minimal inhibitory concentration (MIC) ranged from 16 to 128 µg/ml and it was observed in 50% of the isolates tested. This paradoxical growth in the presence of caspofungin has been observed with *Candida* and *Aspergillus* strains, however, the phenomenon involving oomycetes was described here for the first time.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Pythium insidiosum, a fungus-like microorganism of the Stramenopila kingdom, is the etiological agent of pythiosis in mammals, a difficult disease to treat (Argenta et al., 2008). Zoospore is the infecting form of the disease and is the structure utilized to prepare the inoculum to reproducible *in vitro* and *in vivo* studies (Pereira et al., 2007).

Caspofungin is an echinocandin inhibitor of fungal cell wall (1,3)-β-glucan synthesis (Deresinski and Stevens, 2003). It has the potential to be an effective drug for the treatment of animals with pythiosis due to the high content of β-glucan in the cell wall of oomycetes (Pereira et al., 2007). Some studies have demonstrated the susceptibility of *P. insidiosum* to caspofungin and determined the minimal inhibitory concentration (MIC) (Pereira et al., 2007; Brown et al., 2008). However, a minimum effective concentration (MEC), defined in terms of morphological alterations in hyphae (Espinel-Ingroff, 2003), has not yet been determined for *P. insidiosum* isolates.

Recently, it has been reported that paradoxical turbid growth of *Candida albicans* isolates may occur at high concentrations, and this phenomenon has been registered with several *Candida* spp. (Stevens et al., 2004; Perlin, 2007). Moreover, paradoxical growth has also been described in species of *Aspergillus* (Sóczó et al., 2007).

Thus, the aim of this study was to report the paradoxical growth of Brazilian *P. insidiosum* strains.

2. Materials and methods

This study included 20 Brazilian *P. insidiosum* strains obtained from horses with pythiosis from the South and West-Center Regions of Brazil. The inocula consisted of *P. insidiosum* zoospores in RPMI 1640 broth yielding a final concentration of $2-3 \times 10^3$ zoospores/ml (Argenta et al., 2008).

Caspofungin (MSD SHARP & DOHME GmbH, Haar, Germany) was dissolved in sterile distilled water and serially diluted in RPMI 1640 broth with dextrose (CLSI, 2008) to yield final concentrations from 0.5 to 128 mg/l.

The microdilution technique was performed in accordance with the CLSI document M38-A2 (CLSI, 2008), and all tests were repeated to confirm the results. The criterion for

* Corresponding author at: Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208906; fax: +55 55 32208906.
E-mail address: hartzsa@mail.ufsm.br (S.H. Alves).

casposfungin MIC was determined as the lowest drug concentration at which no growth was evident compared to the drug-free growth control (hyphae growth). Paradoxical growth (PG) was defined as the lowest drug concentration above the MIC at which growth was evident. After 24 h of incubation at 37 °C, the MIC and PG were assessed visually by the presence or absence of hyphae.

3. Results and discussion

The PG of *P. insidiosum* strains in RPMI 1640 broth occurred at supra-MIC concentrations of casposfungin that varied from 16 to 64 µg/ml, while the MICs were 4–32 µg/ml (Table 1). Among the isolates submitted for casposfungin susceptibility testing, the frequency of the PG effect reached 50%.

Some studies have been conducted showing the susceptibility of *P. insidiosum* to antifungal agents, including casposfungin. Pereira et al. (2007) reported MIC of casposfungin for 27 *P. insidiosum* isolates; however, they did not report MECs or the paradoxical effect in such strains. In the present work, we demonstrated the PG of *P. insidiosum*; however, it was not possible to determine the MEC of this oomycete because morphological alterations were not detected in hyphae.

The same strains were tested *in vitro* with other antifungal drugs, including itraconazole, voriconazole, and terbinafine (Argenta et al., 2008), but the PG effect was not observed.

PG of *P. insidiosum* was not observed in casposfungin when a radial growth assay was used (Brown et al., 2008). Currently, PG has been described only for *Candida* and *Aspergillus* species. The mechanism that causes PG remains unknown (Stevens et al., 2005). Some authors have

suggested compensatory upregulation of the synthesis of cell wall components as a possible mechanism (Stevens et al., 2004) because high concentrations of casposfungin appear to stimulate the production of chitin in fungi. Perlin (2007) observed an increase (898%) in the chitin concentration in the cell wall of a *C. albicans* strain that showed PG. This increase seems to be a mechanism to compensate for the reduction of β-1,3 and β-1,6 glucans due to the action of casposfungin (Perlin, 2007).

However, chitin is not present in the cell wall of *Pythium* (Alexopoulos et al., 1996). Therefore, in our opinion, stimulation probably occurs in the production of another cellular component such as cellulose, which is the main cell wall component of this oomycete (Alexopoulos et al., 1996).

The occurrence of PG in some *P. insidiosum* isolates and its absence in others can be explained by the dependent-isolate effect (Cantón et al., 2007). Cantón et al. (2007) reported that the PG of *Candida* spp. strains is more evident when RPMI 1640 broth is the culture medium. Moreover, the frequency of the paradoxical effect was species-, isolate-, and medium-dependent (Cantón et al., 2007). No effect of the incubation time has been reported.

The abilities of subpopulations to survive at high drug concentrations could have *in vivo* consequences (Stevens et al., 2004). The *in vivo* significance of PG remains unclear, since the drug levels required exceed normal dosing levels (Perlin, 2007). It has been suggested that cooperative action of casposfungin and a second drug could eradicate the paradoxical effect (Stevens et al., 2004; Perlin, 2007).

In this study, we report, for the first time, the PG of *P. insidiosum* isolates *in vitro* in the presence of casposfungin. Similarly to other studies that have reported this phenomenon in *Candida* and *Aspergillus*, the clinical implications of this finding in *P. insidiosum* remain unknown.

Table 1

Casposfungin MICs and PG characteristics of twenty clinical *Pythium insidiosum* isolates.

Isolate	MIC (µg/ml) ^a	PG (µg/ml) ^b
LAPEMI 119	16	Nd
LAPEMI 123	16	Nd
LAPEMI 124	32	Nd
LAPEMI 125	32	Nd
LAPEMI 126	16	Nd
LAPEMI 129	16	Nd
LAPEMI 130	32	Nd
LAPEMI 135	16	64
LAPEMI 136	16	Nd
LAPEMI 138	4	16
LAPEMI 144	4	Nd
LAPEMI 147	16	Nd
LAPEMI 148	8	32
LAPEMI 152	16	64
LAPEMI 175	16	64
LAPEMI 178	8	32
LAPEMI 187	8	32
LAPEMI 198	8	32
LAPEMI 205	4	16
LAPEMI 210	8	32

ND: not detected.

^a The MIC endpoint was based on the visual determination of the lowest drug concentration at which no growth was evident.

^b Drug concentration above the MIC with visible growth compared to the control growth.

References

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., 1996. Phylum Oomycota. In: Introductory Mycology, John Wiley & Sons, New York, pp. 683–737.
- Argenta, J.S., Santurio, J.M., Alves, S.H., Pereira, D.L.B., Cavalheiro, A.S., Spanemberg, A., Ferreira, 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.
- Brown, T.A., Grooters, A.M., Hosgood, G.L., 2008. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp. to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, casposfungin, and mefenoxam. AJVR 69, 1463–1468.
- Cantón, E., Pemán, J., Romero, M., Valentín, A., Gobernado, M., 2007. The fungicidal activity and paradoxical effect of casposfungin against yeast. Influence of culture medium and incubation time. Rev. Esp. Quimioter. 20, 433–441.
- Clinical and Laboratory Standards 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 Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
- Deresinski, S.C., Stevens, D.A., 2003. Casposfungin. Clin. Infect. Dis 36, 1445–1457.
- Espinel-Ingroff, A., 2003. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to casposfungin acetate (MK-0991). J. Clin. Microbiol. 41, 403–409.

- Pereira, D.I.B., Santurio, J.M., Alves, S.H., Argenta, J.S., Pötter, 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.
- Perlin, D.S., 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist. Updat.* 10, 121–130.
- Sóczó, G., Kardos, G., Varga, I., Kelentey, B., Gesztelyi, R., Majoros, L., 2007. In vitro study of *Candida tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence of high concentrations of caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4474–4476.
- Stevens, D.A., Espiritu, M., Parmar, R., 2004. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3407–3411.
- Stevens, D.A., Whited, T.C., Perline, D.S., Selitrennikoff, C.P., 2005. Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51, 173–178.

ARTIGO 2

***In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of
terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against
*Pythium insidiosum***

Artigo publicado na revista Veterinary Microbiology



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Research article

In vitro and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*

Juliana S. Argenta^a, Sydney H. Alves^b, Flávio Silveira^b, Grazieli Maboni^b, Régis A. Zanette^a, Ayrton S. Cavalheiro^b, Patrique L. Pereira^b, Daniela I.B. Pereira^c, Elisa S.V. Sallis^c, Luciana Pötter^d, Janio M. Santurio^{b,*}, Laerte Ferreiro^a

^a Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Micologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^c Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil

^d Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-CESNORS), Palmeira da Missões, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2011

Received in revised form 1 December 2011

Accepted 5 December 2011

Keywords:

Pythium insidiosum

Terbinafine

Itraconazole

Caspofungin

Ibuprofen

Fluvastatin

Rabbits

ABSTRACT

The present study investigated the *in vitro* inhibitory activity of terbinafine, itraconazole, caspofungin, fluvastatin and ibuprofen against 15 isolates of *Pythium insidiosum* in double and triple combinations and determined *in vivo* correlations using rabbits with experimental pythiosis. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute M 38-A2 protocol (2008), and the *in vitro* interactions were evaluated using a checkerboard microdilution method. For the *in vivo* study, 20 rabbits inoculated with *P. insidiosum* zoospores were divided into four groups: group 1 was treated with terbinafine and itraconazole; group 2 was treated with terbinafine, itraconazole and fluvastatin; group 3 was treated with terbinafine and caspofungin; and group 4 was the control group. Combinations of terbinafine with caspofungin or ibuprofen were synergistic for 47% of the isolates, and antagonism was not observed in any of the double combinations. The triple combinations were mostly indifferent, but synergism and antagonism were also observed. In the *in vivo* study, the histological aspect of the lesions was similar among the groups, but group 2 showed the lowest amount of hyphae and differed significantly from the other groups.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pythium insidiosum is pathogenic to mammals when zoospores invade the host tissue (De Cock et al., 1987; Mendoza et al., 1993). *P. insidiosum* causes pythiosis, which is a chronic infectious disease that is primarily diagnosed in horses, dogs and humans; however, it has also been described in cattle, sheep, cats and wild species (Gaastra et al., 2010). A unique characteristic of *P. insidiosum* is the

lack of ergosterol in the cytoplasmic membrane (Grooters, 2003), which reduces the effectiveness of antifungal therapies in different species. Nevertheless, a pharmacological cure is occasionally achieved (Shenep et al., 1998).

Studies of *P. insidiosum* susceptibility have been developed to find treatments for this disease through chemotherapy; however, the present study was the first study *in vitro* and *in vivo* to use a triple combination of antifungal and nonantifungal drugs. The lack of effective therapeutic alternatives for pythiosis has increased the interest in investigating the activity of nonantifungal agents and their associations with other agents, including antifungal drugs (Cavalheiro et al., 2009b). The association

* Corresponding author. Tel.: +55 55 32208906; fax: +55 55 32208906.
E-mail address: janio.santurio@gmail.com (J.M. Santurio).

of antifungal agents, mainly azoles, with ibuprofen or statins to treat *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus* spp. has demonstrated synergistic effects *in vitro* (Chin et al., 1997; Pina-Vaz et al., 2005; Qiao et al., 2007).

The aims of the present study were to investigate the *in vitro* inhibitory activity of two-drug and three-drug combinations of terbinafine (TRB), itraconazole (ITC), caspofungin (CAS), fluvastatin (FVT) and ibuprofen (IBP) against 15 isolates of *P. insidiosum* and determine *in vivo* correlations of the same *in vitro* associations in rabbits with experimental pythiosis.

2. Materials and methods

2.1. *In vitro* susceptibility tests

The present study included 15 Brazilian *P. insidiosum* strains that were isolated from horses (13 strains) with pythiosis and rabbits (2 strains) with experimental pythiosis. The identities of these isolates were confirmed by a PCR-based assay (Rodrigues et al., 2006). The inocula prepared for susceptibility tests consisted of *P. insidiosum* zoospores that were obtained following a zoosporogenesis technique. Zoospores were counted in a Neubauer hemacytometer, diluted in RPMI 1640 broth containing L-glutamine and buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS. The final concentration ranged from 2 to 3×10^3 zoospores/ml (Pereira et al., 2007; Argenta et al., 2008) for all susceptibilities tests.

The drugs tested included TRB (Novartis, 0.25–32 mg/l), ITC (Sigma Pharma, 0.25–64 mg/l), CAS (Merck, 0.5–128 mg/l), FVT (Novartis, 1–64 mg/l) and IBP (Whitehall, 4–1024 mg/l). The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute M-38A2 protocol (microdilution method) (CLSI, 2008). For the double combinations, a two-dimensional checkerboard with twofold dilutions of each drug (Cuenca-Estrella, 2004) was used for the study of TRB with ITC, CAS, FVT or IBP and ITC with FVT or IBP. The triple combinations (TRB–ITC–FVT, TRB–ITC–IBP, TRB–ITC–CAS and TRB–FVT–CAS) were tested by a three-dimensional checkerboard technique where the third drug was added at a single concentration on each plate. Each well of the microtiter plates contained 100 μ l of the diluted drug concentrations (150 μ l for the triple combinations) and was inoculated with 100 μ l of the inoculum suspension (50 μ l for the triple combinations). This method resulted in a final volume of 200 μ l. The MIC readings were visual and assessed the presence (i.e., growth) or absence of hyphae after a 24-h incubation at 37 °C. The MIC-0 was used as the reading criteria for this study, which was the lowest drug concentration at which no growth was evident compared with the positive control (hyphae under optimal growth conditions).

Based on the fractional inhibitory concentration index (FICI), interactions were interpreted as synergistic (FICI \leq 0.5), indifferent (0.5 < FICI \leq 4) or antagonistic (FICI > 4) (Johnson et al., 2004) using the formula: FICI = (MIC A in combination/MIC A alone) + (MIC B in combination/MIC B alone) + (MIC C in combination/MIC C alone), where MIC A, MIC B and MIC C indicate the MICs of drugs A, B and C, respectively (Dannaoui et al., 2004). For

double combinations, the third term (C) of the equation was omitted. Off-scale MICs were converted to the next higher dilution for calculation purposes.

2.2. Animal model

The *in vivo* study included twenty three-month-old males New Zealand rabbits that were experimentally infected with *P. insidiosum* strain from horse to evaluate the efficacy of three different treatments for pythiosis. The inoculum consisted of *P. insidiosum* zoospores that were obtained following a zoosporogenesis technique. Zoospores were counted in a Neubauer hemacytometer and diluted in sterile distilled water. All animals received 1 ml of inoculum, which contained approximately 20,000 viable *P. insidiosum* zoospores, subcutaneously in the right costal region as previously described (Santurio et al., 2003; Pereira et al., 2007). Rabbits inoculated with *P. insidiosum* zoospores were divided into four groups with five animals in each: group 1 was treated with TRB + ITC, group 2 was treated with TRB + ITC + FVT, group 3 was treated with TRB + CAS and group 4 was the control group. Treatment started on the 30th day after inoculation. Rabbits in group 1 were treated with 125 mg/day terbinafine and 5 mg/kg/day itraconazole by gavage for 60 days. Rabbits in group 2 were treated with 125 mg/day terbinafine, 5 mg/kg/day itraconazole and 1 mg/kg/day fluvastatin by gavage for 60 days. The rabbits in group 3 were treated with 125 mg/day terbinafine by gavage and 1 mg/kg/day caspofungin by intraperitoneal injection for 28 days. The drugs were dissolved in sterile distilled water. Group 4 (control) did not receive any treatment. Inoculated rabbits were checked every seven days by measuring the subcutaneous nodular area (cm²) using a sliding calliper, and blood samples were obtained every 15 days by intracardiac puncture to examine the plasma concentration of TRB and ITC (groups 1 and 2) (Hurtado et al., 2009).

The rabbits were necropsied at the end of the treatments. Representative fragments of the subcutaneous lesions were fixed in 10% buffered formalin, routinely processed for histopathologic evaluation, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Grocott's stain. An Olympus Oly-200 color video camera coupled to a BX51/BX52 Olympus binocular microscope was used to capture images, as described by Pereira et al. (2008). Images were acquired at 400 \times magnification. Hyphae were quantified using Alpha Ease FC software (Alpha Innotech Corporation version 4.0), and five microscopic fields were used for each slide. The images were converted into 255 greyscale intensities. A dark intensity range (values 0–175), which corresponded to hyphae stained by silver in Grocott's stain, was selected using a selection tool. The data obtained were submitted to statistical analysis. The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria.

2.3. Statistical analysis

The lesional areas of each group were measured every 7 days. After each measurement was made, the average was calculated for each group, and the areas were

converted to percentages using the methodology previously described by Santurio et al. (2003) and Pereira et al. (2007, 2008). The data were subjected to tests of normality and homoscedasticity after processing.

When these assumptions were satisfied, an analysis of variance and the *F* test were performed using a significance level of 5%. A Tukey test was conducted when differences between the treatments were detected. Regression analyses regarding the dates of the measurements were also performed, and adjustments to the polynomial model were performed to the third order. The analyses were performed using the SAS software package (SAS Institute, Inc., Cary, NC, 2001).

3. Results

3.1. *In vitro*

The *in vitro* susceptibilities of *P. insidiosum* to individual drugs (TRB, ITC, CAS, IBP and FVT) are listed in Table 1. Terbinafine showed the best activity of the drugs. Indeed, the MIC ranged from 2 to 16 mg/l, and the minimal concentration to inhibit the growth of 90% of the isolates was 8 mg/l. Interestingly, IBP and FVT did not show antifungal activity.

The susceptibilities of *P. insidiosum* to double combinations are shown in Table 2. The combinations of TRB + CAS and ITC + IBP exhibited synergistic effects against seven (46.7%) *P. insidiosum* isolates, and the combination of TRB + ITC was synergistic against six (40%) isolates. In addition, the combination of TRB and IBP as well as TRB and FVT each exhibited synergistic effects against only one (6.7%) isolate, whereas the combination of ITC plus FVT was synergistic against two isolates (13.3%). Antagonistic effects were not observed in two-drug association.

The triple combination of TRB + ITC + IBP was synergistic against six (40%) isolates, and TRB + ITC + FVT was synergistic against three (20%) isolates. Interestingly, the combinations of TRB + ITC + CAS and TRB + FVT + CAS exhibited synergistic effects against only one (6.7%) strain (Table 3). Antagonistic effects were noted in triple combinations of TRB + ITC + FVT (20%), TRB + ITC + IBP (6.7%), TRB + ITC + CAS (6.7%) and TRB + FVT + CAS (6.7%).

3.2. *In vivo*

The rabbits developed granulomatous subcutaneous nodules 20 days after inoculation of the zoospores, and the

Table 1

In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* (n=15) to terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin.

Antifungal agent	MIC (mg/l)			
	Range ^a	Mode	MIC ₅₀ ^b	MIC ₉₀ ^c
Terbinafine	2–16	8	8	8
Itraconazole	16–>32	>16	32	>32
Caspofungin	8–128	16	16	64
Ibuprofen	128–1024	512	512	1024
Fluvastatin	32–>128	64	64	64

^a Range between the lowest and highest MICs for all isolates.

^b Minimal concentration to inhibit the growth of 50% of the isolates.

^c Minimal concentration to inhibit the growth of 90% of the isolates.

Table 2
In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* (n = 15) to terbinafine combined with itraconazole, ibuprofen, fluvastatin or caspofungin and itraconazole combined with fluvastatin or ibuprofen.

Isolate ^a	MIC of combination (mg/l)					FICI (Interp.) ^c	FICI (Interp.)	ITC	IBP	FICI (Interp.)	
	TRB	ITC	FICI ^b (Interp.) ^c	TRB	IBP						
LAPEMI 124	2	2	0.3(S)	8	256	2(0)	16	1	64	2(0)	0.1(S)
LAPEMI 129	2	1	0.3(S)	8	256	1.3(0)	8	16	64	2.3(0)	0.5(S)
LAPEMI 135	4	0.5	1(0)	8	256	2.5(0)	2	>16	>16	2(0)	0.1(S)
LAPEMI 138	2	0.5	1(0)	4	256	2.5(0)	4	>16	>32	2(0)	2.3(0)
LAPEMI 148	4	0.5	1(0)	8	128	2.3(0)	8	>16	>16	2(0)	2.3(0)
LAPEMI 152	4	0.5	1(0)	4	256	1.5(0)	2	>16	>32	2(0)	8
LAPEMI 178	4	0.5	1(0)	4	256	3(0)	4	16	64	1.5(0)	1(0)
LAPEMI 187	1	0.5	0.1(S)	8	256	1.5(0)	8	16	32	0.8(0)	0.3(S)
LAPEMI 198	4	0.5	0.5(S)	2	256	1.3(0)	4	16	64	1.5(0)	0.3(S)
LAPEMI 205	2	1	1(0)	4	256	3(0)	4	16	32	2.1(0)	0.6(0)
LAPEMI 210	2	0.5	1(0)	4	128	3(0)	4	64	4	1.5(0)	3(0)
LAPEMI 216	8	0.5	1(0)	8	128	2(0)	4	>16	>16	1.5(0)	1(0)
LAPEMI 223	8	0.5	1(0)	4	128	0.8(0)	4	>32	>64	1.5(0)	0.3(S)
LAPEMI C20	4	0.5	0.5(S)	8	128	1.5(0)	8	16	16	0.8(0)	0.1(S)
LAPEMI C28	8	0.5	0.5(S)	4	128	1.3(0)	4	4	2	0.2(S)	3(0)

^a LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas.

^b Fractional inhibitory concentration index.

^c Interp., interpretation; S, synergistic; I, indifferent.

Table 3
In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* (n = 15) against the triple combinations of terbinafine, itraconazole and fluvastatin; terbinafine, itraconazole and ibuprofen; terbinafine, itraconazole and caspofungin; and terbinafine, fluvastatin and caspofungin.

Isolate ^a	MIC of combination (mg/l)															
	TRB	ITC	FVT	FIC ^b (Interp.) ^c	TRB	ITC	IBP	FIC (Interp.)	TRB	ITC	CAS	FIC (Interp.)	TRB	FVT	CAS	FIC (Interp.)
LAPEMI 124	8	0.5	8	1.3(I)	8	0.5	32	1(I)	8	0.5	1	1(I)	16	16	2	2.3(I)
LAPEMI 129	4	0.5	4	0.6(I)	8	0.5	32	1(I)	8	0.5	16	2(I)	8	8	16	2.3(I)
LAPEMI 135	4	0.5	4	1.1(I)	8	0.5	32	2.1(I)	8	0.5	4	2.3(I)	4	64	4	3.3(I)
LAPEMI 138	8	0.5	4	4.1(A)	8	0.5	64	4.1(A)	8	0.5	2	4.1(A)	4	8	4	4.3(A)
LAPEMI 148	8	0.5	8	2.3(I)	<1	<0.5	<256	0.4(S)	8	0.5	2	2.1(I)	4	8	32	3.3(I)
LAPEMI 152	1	0.5	2	0.3(S)	1	0.5	32	0.3(S)	2	0.5	1	0.6(I)	2	2	8	1(I)
LAPEMI 178	2	0.5	2	0.6(I)	2	0.5	32	0.8(I)	4	0.5	1	1.1(I)	4	8	16	3.3(I)
LAPEMI 187	8	0.5	2	1(I)	8	0.5	32	1.1(I)	8	0.5	8	1.1(I)	8	8	32	1.4(I)
LAPEMI 198	8	0.5	4	1.1(I)	8	0.5	64	1.3(I)	8	0.5	2	1.1(I)	8	32	16	2(I)
LAPEMI 205	8	0.5	8	4.3(A)	<1	<0.5	<256	1.3(I)	4	0.5	1	2.1(I)	1	16	2	1.3(I)
LAPEMI 210	8	0.5	2	4.1(A)	2	2	32	1.3(I)	8	1	1	4(I)	1	16	16	1.3(I)
LAPEMI 216	2	2	16	0.3(S)	<2	<1	<64	0.4(S)	8	0.5	2	1(I)	2	8	16	0.5(S)
LAPEMI 223	8	0.5	8	1.1(I)	2	0.5	32	0.3(S)	8	0.5	2	1.1(I)	2	32	16	1.8(I)
LAPEMI C20	8	0.5	2	1(I)	4	0.5	2	0.5(S)	8	0.5	1	1.1(I)	2	16	16	1.5(I)
LAPEMI C28	4	0.5	4	0.3(S)	<1	<0.5	<64	0.3(S)	2	0.5	2	0.4(S)	16	8	16	3.1(I)

^a LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Microbiológicas.

^b Fractional inhibitory concentration index.

^c Interp., interpretation: S, synergistic; I, indifferent; A, antagonistic.

areas ranged from 0.9 to 60 cm² by the end of treatments. One rabbit from group 1 and one rabbit from group 2 died between the 5th and 6th weeks after inoculation. Two animals from group 3 that were necropsied at the end of the treatment had pythiosis lesions in the lungs and kidneys.

The lesional areas were compared at the end of the treatments using the Tukey test. Group 2 differed from the other groups ($P < 0.0001$), but there were no other differences between groups. From the regression analysis of the lesional measurements, group 1 did not fit any regression model and presented an average value of 15.60% relative to the size of the lesions. However, group 2 ($Y = 4.5686 - 2.8199x + 0.0467x^2$, $R^2 = 64.11\%$; $P = 0.0095$) presented a quadratic response with smaller lesional sizes, as observed on the 30th day after the initiation of treatment in the animals. Similarly, group 3 ($Y = 26.12 + 2.535x - 0.03758x^2$, $R^2 = 52.05\%$; $P = 0.042$) presented a quadratic response with greater lesional sizes at the 34th day after the initiation of treatment, while group 4 ($Y = 1.3217x + 5.7892$, $R^2 = 52.46\%$; $P = 0.0178$) showed an increasing linear response with an increase of 1.3217% in size per day of treatment.

Although the histological aspects of the lesions were similar in all groups, there was variation in the number of *P. insidiosum* hyphae when we used 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. Hyphae-like structures surrounded by eosinophilic material could be observed in the necrotic areas and corresponded to Splendore-Hoeppli phenomenon. Inflammatory infiltrate was composed of eosinophils, plasma cells, lymphocytes, macrophages, epithelioid cells and Langhans' giant cells. Some of these giant cells had hyphae in their interior.

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. Morphometric analysis demonstrated that the lesions in the rabbits of group 4 (control group) had a greater number of hyphae compared with the lesions in the rabbits treated with terbinafine, itraconazole and fluvastatin (group 2) ($P < 0.05$).

4. Discussion

The lack of an adequate therapy for pythiosis has encouraged the search of new proposals. Based on previous studies focusing on antimycotics from different clones or antifungal plus nonantifungal agents for fungi showing primary or acquired resistance, we performed *in vitro* studies to investigate the efficacy of various drug combinations against *P. insidiosum* (Arai et al., 2005).

P. insidiosum isolates exhibited different degrees of sensitivity to statin, ibuprofen and antifungal agents. The nonantifungal agents showed weak antifungal activity against *P. insidiosum* when tested alone. When the nonantifungal agents were tested in combination with

antifungal agents, the MIC values were smaller than the individual MICs. The MICs of ibuprofen alone and in combination with other drugs ranged from 138 to 1024 mg/l and 2 to 256 mg/l, respectively. Fluvastatin individual MICs ranged from 32 to >128 mg/l, whereas the MICs of fluvastatin in all combinations tested ranged from 1 to >64 mg/l. Prior studies have shown that a concentration of 1 mg/l of fluvastatin is clinically relevant (Nash et al., 2002).

At concentrations between 64 and 128 mg/l, fluvastatin caused a 100% inhibition of growth (no visible growth) for *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* (Chin et al., 1997). In addition, a separate study found that fluvastatin demonstrated an MIC above 2 mg/l against eight isolates of *C. albicans* when this statin was evaluated in combination with fluconazole (Nash et al., 2002). These authors also suggested that the lack of synergism between fluconazole and fluvastatin was due to the low concentrations of fluvastatin used in the study.

The cholesterol-lowering drug fluvastatin has been reported to exhibit synergistic interactions with azoles against *Candida* and filamentous fungi (Chin et al., 1997). The mechanism of antifungal activity, however, is not clear. Combinations of statins and itraconazole were also tested against *Aspergillus* species, but the MICs of statins were extremely high (4–>256 mg/l) and exceeded the plasma concentrations achievable in clinical doses (Qiao et al., 2007).

Ibuprofen possesses a potent fungicidal activity by causing membrane lesions and blocking efflux pumps; however, lower concentrations of ibuprofen are fungistatic (Pina-Vaz et al., 2005). Several studies examining the combination of fluconazole and ibuprofen observed a synergistic effect, primarily in fluconazole-resistant *C. albicans* strains (Pina-Vaz et al., 2005; Arai et al., 2005); however, there are not much data on the possible interactions between fluconazole and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Hynninen et al., 2006).

Terbinafine plus ibuprofen was indifferent for 93.3% of isolates studied. Cavalheiro et al. (2009b) showed similar results for metronidazole, rifampicin, ibuprofen, fluvastatin and amphotericin B alone or in double association with terbinafine. Interestingly, Cavalheiro et al. (2009b) found 41.18% and 17.65% synergism for the combinations of terbinafine and amphotericin B and terbinafine and ibuprofen, respectively. A previous report of the combination of terbinafine and fluvastatin showed antagonism and indifference, but not synergism (Cavalheiro et al., 2009b), which differed from the present study where one isolate was synergistic and no antagonism was observed.

In another study, Cavalheiro et al. (2009a) found 41.18% synergism for the combination of terbinafine plus caspofungin. In agreement with this finding, the present study found that the combination of terbinafine and caspofungin had a synergistic effect in over 45% of the samples. The different mechanisms of action of echinocandin and allylamine antifungal agents make them likely candidates for combination therapy because echinocandins inhibit the synthesis of 1,3- β -D-glucan and allylamines inhibit the synthesis of ergosterol by inhibiting squalene-epoxidase (Ghannoum and Rice, 1999). Although we found that the

combination of terbinafine plus itraconazole exhibited synergistic effects in 40% of isolates, another study using the same drugs with a macro technique only observed synergism in 17% of isolates (Argenta et al., 2008).

In the present work, which describes the first results of the use of antifungal and nonantifungal agents in triple combinations against *P. insidiosum* *in vitro* and *in vivo*, the triple combinations tested displayed a synergistic effect and indifference against the studied isolates. Statins have been shown to exert potent antifungal activities against a wide variety of clinically important fungal pathogens (Nyilasi et al., 2010), and the combination of fluvastatin with terbinafine, itraconazole or caspofungin resulted in synergistic effects. The extent of inhibition was higher when terbinafine, itraconazole and fluvastatin were applied together. Indeed, the combination of terbinafine, itraconazole and fluvastatin was synergistic against 20% of the isolates, which was the second most effective triple combination.

The C_{max} for fluvastatin after doses of 20–40 mg/day ranged from 100 to 300 ng/ml in plasma (Nash et al., 2002). Interestingly, a previous study found that the concentration of other statins needed to inhibit *Aspergillus fumigatus* growth was higher than the therapeutic concentration (58 mg/l for atorvastatin and 0.4 mg/l for simvastatin) (Qiao et al., 2007).

The *in vivo* experiments were developed based on the best results of previous *in vitro* studies that assessed various treatment combinations. Drug combinations that included ibuprofen were not used in rabbits because of the severe gastritis that is caused by repeated doses of this drug (Hynninen et al., 2006).

Although the morphometric analysis demonstrated that the lesions in the rabbits of the control group had a greater number of hyphae compared with the lesions in the rabbits of the treated groups, only one rabbit in the group treated with terbinafine, itraconazole and fluvastatin was cured (i.e., complete disappearance of the lesion at necropsy). In part, this result can be explained by the plasma levels of terbinafine and itraconazole (Hurtado et al., 2009), which were far below the desired levels. Additionally, one study demonstrated that treatment with a combination of terbinafine and itraconazole cured a child with ophthalmic pythiosis (Shenep et al., 1998; Sudjaritruk and Sirisanthana, 2011). Serum levels of itraconazole following treatment with terbinafine and itraconazole ranged from 1.0 μ g/ml to 2.1 μ g/ml after an oral dose of 8 mg/kg/day (Shenep et al., 1998). Another study found that oral administration of terbinafine, a saturated solution of potassium iodide and amphotericin B successfully treated the cutaneous form of pythiosis (Laohapensang et al., 2009).

Although one study showed that caspofungin elicited fungistatic activity in rabbits with experimental pythiosis (Pereira et al., 2007), the combination of terbinafine and caspofungin *in vivo* had not been previously described. The *in vitro* results of the present study prompted us to investigate the combination of terbinafine and caspofungin in rabbits.

In conclusion, based on the *in vitro* and *in vivo* data reported here, the present study demonstrated a weak

correlation between *in vitro* findings and the responses generated by the rabbits; however, the triple combinations of drugs deserve attention and provide as a new chemotherapy therapeutic alternative for pythiosis. Furthermore, other studies using these and other drugs against diverse *P. insidiosum* strains will be needed for a better understanding of this species' susceptibility.

References

- Arai, R., Sugita, T., Nishikawa, A., 2005. Reassessment of the *in vitro* synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. *Mycoses* 48, 38–41.
- Argenta, J.S., Santurio, J.M., Alves, S.H., Pereira, D.I.B., Cavalheiro, A.S., 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.
- Cavalheiro, A.S., Maboni, G., de Azevedo, M.I., Argenta, J.S., Pereira, D.I., Spader, T.B., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2009a. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2136–2138.
- Cavalheiro, A.S., Zanette, R.A., Spader, T.B., Lovato, L., Azevedo, M.I., Botton, S., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2009b. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Vet. Microbiol.* 137, 408–411.
- Chin, N.-X., Weitzman, I., Della-Latta, P., 1997. *In vitro* activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 850–852.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, second edition, CLSI Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA. ISBN: 1-56238-668-9.
- Cuenca-Estrella, M., 2004. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 854–869.
- Dannaoui, E., Lortholary, O., Dromer, F., 2004. *In vitro* evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 970–978.
- De Cock, A.W.A.M., Mendoza, L., Padhye, A.A., Ajello, A., Kaufman, L., 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. *J. Clin. Microbiol.* 25, 344–349.
- Gaastra, W., Lipman, L.J., De Cock, A.W., Exel, T.K., Pegge, R.B., Scheurwater, J., Vilela, R., Mendoza, L., 2010. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet. Microbiol.* 146, 1–16.
- Ghannoum, M.A., Rice, L.B., 1999. Antifungal agents: mode of action mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 501–517.
- Grooters, A.M., 2003. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 33, 695–720.
- Hurtado, F.K., Torres, B.G.S., Souto, G.D., Argenta, J.S., Alves, S.H., Santurio, J.M., Rolim, C.M.B., 2009. Liquid–liquid extraction followed by HPLC for the simultaneous analysis of itraconazole and terbinafine in rabbit plasma. In: CIFARP 2009 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, SP, Abstracts.
- Hynninen, V.V., Oikola, K.T., Leino, K., Lundgren, S., Neuvonen, P.J., Rane, A., Valtonen, M., Vyyryläinen, H., Laine, K., 2006. Effects of the antifungals voriconazole and fluconazole on the pharmacokinetics of S-(+)- and R-(–)-ibuprofen. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1967–1972.
- Johnson, M.D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J.R., Rex, J.H., 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 693–715.
- Laohapensang, K., Rutherford, R.B., Supabandhu, J., Vanittanakom, N., 2009. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. *Vascular* 17, 234–238. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Vanittanakom%20N%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract
- Mendoza, L., Hernandez, F., Ajello, L., 1993. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2967–2973.
- Nash, J.D., Burgess, D.S., Talbert, R.L., 2002. Effect of fluvastatin and provastatin HMG-CoA reductase inhibitors, on fluconazole activity against *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 51, 105–109.
- Nyilasi, I., Kocsubé, S., Pesti, M., Lukács, G., Papp, T., Vágvolgyi, C.J., 2010. *In vitro* interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. *J. Med. Microbiol.* 59, 200–205.
- Pereira, D.I.B., Santurio, J.M., Alves, S.H., Argenta, J.S., Pötter, 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.
- Pereira, D.I.B., Santurio, J.M., Alves, S.H., Azevedo, M.I., Silveira, F., Costa, F.F., Sallis, E.S.V., Pötter, L., Ferreiro, L., 2008. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. *J. Mycol. Med.* 18, 129–133.
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Costa-de-Oliveira, S., Ricardo, E., Mardh, P.A., 2005. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 678–685.
- Qiao, J., Kontoyiannis, D.P., Wan, Z., Liu, W., 2007. Antifungal activity of statins against *Aspergillus* species. *Med. Mycol.* 45, 589–593.
- Rodrigues, A., Graça, D.L., Fontoura, C., Cavalheiro, A.S., Henzel, A., Schwendler, S.E., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2006. Intestinal dog pythiosis in Brazil. *J. Mycol. Med.* 16, 37–41.
- Santurio, J.M., Leal, A.T., Leal, A.B.M., Festugatto, R., Lubeck, I., Sallis, E.S., Copetti, M.V., Alves, S.H., Ferreiro, L., 2003. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosum developed and evaluated. *Vaccine* 21, 2535–2540.
- SAS, 2001. Statistical Analysis System User's Guide: Statistics Version 8. 2. Statistical Analysis System Institute, Cary, p. 1686.
- Shenep, J.L., English, B.K., Kaufman, L., Pearson, T.A., Thompson, J.W., Kaufman, R.A., Frisch, G., Rinaldi, M.G., 1998. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clin. Infect. Dis.* 27, 1388–1393.
- Sudjaritruk, T., Sirisanthana, V., 2011. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. *BMC Infect. Dis.* 11, 33.

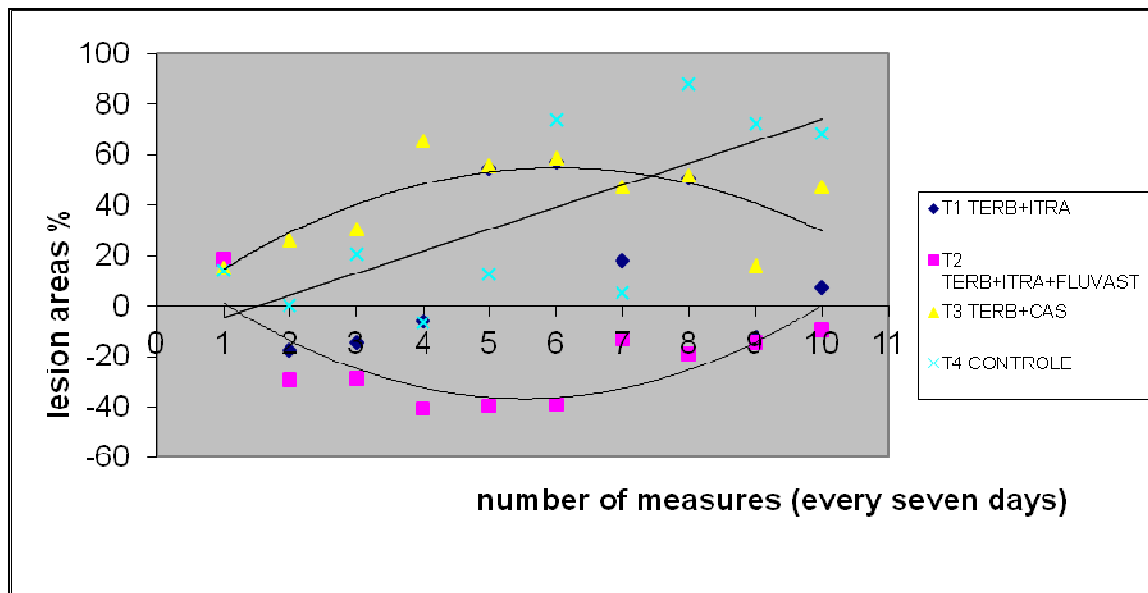
FIGURA SUPLEMENTAR DO ARTIGO 2 (NÃO INCLUÍDA PARA PUBLICAÇÃO)

Figure 1. Percent variation of subcutaneous lesioned areas in rabbits experimentally inoculated with *Pythium insidiosum* and treated with a combination of terbinafine and itraconazole (group 1); terbinafine, itraconazole and fluvastatin (group 2); terbinafine and caspofungin (group 3), or control (group 4).

4. DISCUSSÃO

A falta de uma terapia adequada para pitiose tem incentivado a busca de novas propostas. Baseados em estudos *in vitro* focando diferentes antimicóticos ou agentes antifúngicos combinados a não-antifúngicos, nós investigamos a eficácia de várias combinações de fármacos contra *P. insidiosum*.

Isolados de *P. insidiosum* apresentaram diferentes graus de sensibilidade ao ibuprofeno, a estatina e aos agentes antifúngicos. Os agentes não-antifúngicos mostraram fraca atividade antifúngica contra *P. insidiosum* quando testados sozinhos. Quando os agentes não-antifúngicos foram testados em combinação com antifúngicos, a CIM foi menor do que as CIMs individuais. As CIMs de ibuprofeno isoladamente e em combinação com outros fármacos variaram de 128 a 1024 mg/l e 2 a 256 mg/l, respectivamente. As CIMs individuais da fluvastatina variaram de 32 a >128 mg/l, enquanto que as CIMs da fluvastatina em todas as combinações testadas variaram de 1 a >64 mg/l. Estudos anteriores mostraram que uma concentração de 1 mg/l de fluvastatina é clinicamente relevante (NASH *et al.*, 2002).

Concentrações de fluvastatina entre 64 e 128 mg/l causaram uma inibição do crescimento de 100% (sem crescimento visível) para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (CHIN *et al.*, 1997). Além disso, em outro estudo a fluvastatina demonstrou uma CIM acima de 2 mg/l contra oito isolados de *C. albicans* quando esta estatina foi avaliada em combinação com fluconazol (NASH *et al.*, 2002). Esses autores também sugeriram que a ausência

de sinergismo entre fluconazole e fluvastatina foi devido à baixa concentração de fluvastatina utilizada no estudo.

A fluvastatina, fármaco redutor de colesterol, tem sido relatada com interações sinérgicas com azóis contra *Candida* spp. e fungos filamentosos (CHIN *et al.*, 1997). O mecanismo da atividade antifúngica, no entanto, não é claro. Combinações de estatinas e itraconazol também foram testados contra espécies de *Aspergillus* spp., mas as CIMs das estatinas foram extremamente elevadas (4 a >256 mg/l) e superou as concentrações plasmáticas encontradas em doses clínicas (QIAO *et al.*, 2007).

O ibuprofeno possui uma potente atividade fungicida, causando lesões da membrana e bloqueio de bombas de efluxo; no entanto, baixas concentrações de ibuprofeno são fungistáticas (PINA-VAZ *et al.*, 2005). Em vários estudos sobre a combinação de fluconazol e ibuprofeno foi observado um efeito sinérgico, principalmente em isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (PINA-VAZ *et al.*, 2005; ARAI *et al.*, 2005); entretanto, não há muitos dados sobre as possíveis interações entre fluconazol e anti-inflamatórios não-esteroidais (HYNNINEN *et al.*, 2006).

A associação terbinafina + ibuprofeno foi indiferente para 93,3% dos isolados estudados. Cavalheiro *et al.* (2009b) mostraram resultados similares para metronidazol, rifampicina, ibuprofeno, fluvastatina e anfotericina B isoladamente ou em associação dupla com terbinafina. Curiosamente, Cavalheiro *et al.* (2009b) encontraram 41,18% e 17,65% de sinergismo para as combinações de terbinafina e anfotericina B ou ibuprofeno, respectivamente. Ainda neste estudo, a combinação de terbinafina e fluvastatina mostrou antagonismo e indiferença, mas

não sinergismo (CAVALHEIRO *et al.*, 2009b), o que difere do presente estudo, no qual um isolado teve resultado sinérgico e não foi observado antagonismo.

Em outro estudo, Cavalheiro *et al.* (2009a) encontraram 41,18% de sinergismo para a combinação de terbinafina e caspofungina. De acordo com este achado, o presente estudo constatou que a combinação de terbinafina e caspofungina teve efeito sinérgico em mais de 45% das amostras. Os diferentes mecanismos de ação das equinocandinas e alilaminas tornam estes agentes antifúngicos prováveis candidatos para uso em combinações terapêuticas, pois as equinocandinas inibem a síntese de 1,3- β -D-glucana e as alilaminas, a síntese de ergosterol, inibindo esqualeno epoxidase (GHANNOUM & RICE, 1999). Embora nós tenhamos encontrado efeitos sinérgicos em 40% dos isolados frente a combinação de terbinafina mais itraconazol, em um outro estudo com a mesma associação utilizando uma técnica de macrodiluição foi observado sinergismo somente em 17% dos isolados (ARGENTA *et al.*, 2008).

Ainda, no presente estudo, foi observado o efeito paradoxal de alguns isolados de *P. Insidiosum* frente a caspofungina quando testada isoladamente. No entanto, Brown *et al.* (2008) não observaram crescimento paradoxal de *P. insidiosum* testando caspofungina através de um ensaio de crescimento radial. Atualmente, o efeito paradoxal tem sido descrito apenas para espécies de *Candida* e *Aspergillus*. O mecanismo que provoca o crescimento paradoxal permanece desconhecido (STEVENS *et al.*, 2005). Alguns autores tem sugerido regulação compensatória da síntese de componentes da parede celular como um possível mecanismo (STEVENS *et al.*, 2004), porque altas concentrações de caspofungina parecem estimular a produção de quitina em fungos.

Perlin (2007) observaram um aumento (898%) na concentração de quitina na parede celular de uma cepa de *C. albicans*, que mostrou crescimento paradoxal. Este aumento parece ser um mecanismo para compensar a redução de β -1,3 e β -1,6 glucanas devido à ação da caspofungina. No entanto, a quitina não está presente na parede celular de *Pythium* spp. (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Portanto, provavelmente há estimulação de outro componente celular, como celulose, que é o componente principal da parede celular deste oomiceto (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

A ocorrência do crescimento paradoxal em alguns isolados de *P. insidiosum* e sua ausência em outros pode ser explicada pelo efeito isolado-dependente. Cantón *et al.* (2007) relataram que o crescimento paradoxal de isolados de *Candida* spp é mais evidente quando o caldo RPMI 1640 é o meio de cultura. Além disso, a frequência do efeito paradoxal foi dependente da espécie, da amostra e do meio. Nenhum efeito do tempo de incubação tem sido relatado.

As habilidades de subpopulações sobreviver em concentrações elevadas do fármaco poderiam ter consequências *in vivo* (STEVENS *et al.*, 2004). O significado *in vivo* do efeito paradoxal permanece incerto, uma vez que os níveis de droga necessários excedem os níveis normais de dosagem (PERLIN, 2007). Tem sido sugerido que a ação cooperativa de caspofungina e uma segunda droga pode erradicar o efeito paradoxal (STEVENS *et al.* 2004, PERLIN, 2007).

No presente trabalho, o qual descreve os primeiros resultados do uso de antifúngicos e não-antifúngicos em combinações triplas contra o *P. insidiosum in vitro* e *in vivo*, as combinações triplas testadas exibiram um efeito sinérgico e indiferença contra os isolados estudados. As estatinas tem exercido potente

atividade antifúngica contra uma grande variedade de patógenos fúngicos clinicamente importantes (NYILASI *et al.*, 2010), e a combinação de fluvastatina com terbinafina, itraconazol ou caspofungina resultou em efeitos sinérgicos. A extensão da inibição foi maior quando a terbinafina, itraconazol e fluvastatina foram aplicados em conjunto. Na verdade, a combinação de terbinafina, itraconazol e fluvastatina foi sinérgica contra 20% dos isolados, sendo a segunda combinação tripla mais eficaz.

A C_{max} para a fluvastatina após doses de 20-40 mg/dia variou entre 100-300 ng/ml no plasma (NASH *et al.*, 2002). Curiosamente, um estudo anterior descobriu que a concentração de outras estatinas necessárias para inibir o crescimento de *Aspergillus fumigatus* foi maior do que a concentração terapêutica (58 mg/l para a atorvastatina e de 0,4 mg/l de sinvastatina) (QIAO *et al.*, 2007).

O experimento *in vivo* foi desenvolvido com base nos melhores resultados do estudo prévio *in vitro* que avaliou várias combinações de tratamentos. Combinações de drogas que incluíam o ibuprofeno não foram utilizadas nos coelhos devido a gastrite severa que é causada por doses repetidas dessa droga (HYNNINEN *et al.*, 2006).

Embora as análises morfométricas demonstraram que as lesões nos coelhos do grupo controle apresentou um maior número de hifas em comparação com as lesões nos coelhos dos grupos tratados, apenas um coelho no grupo tratado com terbinafina, itraconazol e fluvastatina foi curado (ie, desaparecimento completo da lesão no momento da necropsia). Em parte, este resultado pode ser explicado pelos níveis plasmáticos de terbinafina e itraconazol (HURTADO *et al.*, 2009), que foram muito abaixo dos níveis desejados. Além disso, estudos

demonstraram que o tratamento com uma combinação de terbinafina e itraconazol curou uma criança com pitiose oftálmica (SHENEP *et al.*, 1998;. SUDJARITRUK & SIRISANTHANA, 2011). Os níveis séricos de itraconazol após o tratamento com terbinafina e itraconazol variou de 1,0 µg/ml a 2,1 µg/ml após uma dose oral de 8 mg/kg/dia (SHENEP *et al.*, 1998). Outro estudo demonstrou que a administração oral de terbinafina, uma solução saturada de iodeto de potássio e anfotericina B foi utilizada com sucesso para tratar a forma cutânea de pitiose (LAOHAPENSANG *et al.*, 2009).

Embora Pereira *et al.* (2007) tenham demonstrado a atividade fungistática da caspofungina em coelhos com pitiose experimental, a combinação de terbinafina e caspofungina *in vivo* não havia sido investigada anteriormente. Os resultados deste estudo nos levou a investigar a combinação de terbinafina e caspofungina em coelhos. No entanto os resultados não foram os esperados.

5. CONCLUSÕES

1. A terbinafina testada individualmente mostrou-se fungicida *in vitro*, mas os demais fármacos testados sozinhos não evidenciaram atividade fungicida frente aos isolados de *P. insidiosum* estudados;
2. A caspofungina demonstrou crescimento paradoxal em alguns isolados de *P. insidiosum* em testes de suscetibilidade, não apresentando o mesmo efeito quando este fármaco foi testado em associações com outros fármacos;
3. Nas associações duplas *in vitro* obteve-se a maior eficácia quando se testou terbinafina+caspofungina e itraconazol+ibuprofeno e nas combinações triplas quando se testou terbinafina, itraconazol e ibuprofeno, seguida da associação de terbinafina, itraconazol e fluvastatina;
4. Houve fraca correlação entre os achados *in vitro* e *in vivo*, onde apenas um coelho, tratado com a associação terbinafina, itraconazol e fluvastatina, obteve cura clínica confirmada pelo desaparecimento da lesão após necropsia.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: _____. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. Chap. 23, p. 683-737.

ALLISON, N. & GILLIS, J.P. Enteric pythiosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 196, n. 3, p. 462-464, 1990.

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.

ARAI, R.; SUGITA, T.; NISHIKAWA, A. Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. **Mycoses**. v. 48, p. 38-41, 2005.

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 and Chemotherapy**. v. 52, p. 767-769, 2008.

BALFOUR, J.A. & FAULDS, D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potencial in superficial mycoses. **Drugs**. v. 43, p. 259-284, 1992.

BENNET, J.E. Antimicrobianos (continuação) – Agentes antifúngicos. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10^aed, Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2003, p. 971-983.

BENTINCK-SMITH, J. et al. Canine pythiosis-isolation and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, p. 295-298, 1989.

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

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

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.

BROWN, C.C. & ROBERTS, E.D. Intestinal pythiosis in a horse. **Australian Veterinary Journal**. v. 65, n. 3, p. 88-89, 1988.

BROWN, C.C. et al. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. **American Journal of Veterinary Research**. v. 49, n. 11, p. 1866-1868, 1988.

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.

CANTÓN, E. et al. The fungicidal activity and paradoxical effect of caspofungin against yeast. Influence of culture medium and incubation time. **Revista Espanola de Quimioterapia**. v. 20, p. 433-441, 2007.

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

CAVALHEIRO, A.S. et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**. v. 137, p. 408–411, 2009b.

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.

CHAIPRASER, A. et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**. v. 33, n. 6, p. 317-323, 1990.

CHIN, N.-X.; WEITZMAN, I.; DELLA-LATTA, P. *In vitro* activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 4, p. 850-852, 1997.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 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 Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.

CONNOLE, M.D. Equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 49, p. 214-215, 1973.

COSTA, E.O. & GÓRNIAC, S.L. Agentes Antifúngicos e Antivirais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 430-442.

CUENCA-ESTRELLA, M. & RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? **Revista Iberoamericana de Micología** v. 19, p. 133-138, 2002.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, p. 854–869, 2004.

DANNAOUI, E.; LORTHOLARY, O.; DROMER F. *In Vitro* Evaluation of Double and Triple Combinations of Antifungal Drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, p. 970–978, 2004.

DAVIS, R. & BALFOUR, J.A. Terbinafine. A pharmaco-economic evaluation of its use in superficial fungal infections. **Pharmacoeconomics**. v. 8, n. 3, p. 253-269, 1995.

DATRY, A. & BART-DELABESSE, E. La caspofungine: du mécanisme d'action aux applications thérapeutiques. **La revue de médecine interne**. v. 27, n. 1, p. 32-39, 2006.

DE COCK, A.W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.

DERESINSKI, S.C. & STEVENS, D.A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**. v. 36, p. 1445-1457, 2003.

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

ENGLISH, P.B. & FROST, A.J. Phycomycosis in a dog. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 291-292, 1984.

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

FOIL, C.S.O. et al. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium* spp. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 20, p. 959-966, 1984.

FOIL, C.S.O. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**. p. 57-63, 1996.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**.

v. 146, p. 1–16, 2010.

GALGÓCZY, L. et al. Statins as antifungal agents. **World Journal of Clinical Infectious Diseases**. v. 1, p. 4-10, 2011.

GHANNOUM, M.A. & RICE, L.B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GONZÁLEZ, G.M. et al. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis* in vitro and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 6, p. 1854-1859, 2001.

GONZÁLES, H. E. et al. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. **Revista ICA**. v. XIV, n. 2, p. 115-122, 1979.

GOSBELL, I.B. et al. Cure of orthopaedic infection with *Scedosporium prolificans*, using voriconazole plus terbinafine, without the need for radical surgery. **Mycoses**. v. 46, p. 233-236, 2003.

GROLL, A.H. et al. Compartmental pharmacokinetics of the antifungal echinocandin caspofungin (MK-0991) in rabbits. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 2, p. 596-600, 2001.

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.

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

GROOTERS, A.M. et al. Clinicopathologic findings associated with *Lagenidium* sp. infection in 6 dogs: Initial description of an emerging Oomycosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 17, p. 637-646, 2003.

HADJU, R. et al. Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agent MK-0991 (L-743,872). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 11, p. 2339-2344, 1997.

HEADLEY, S.A. & ARRUDA, H.N. Equine cutaneous pythiosis: a report of four cases. **Ciência Rural**. v. 34, n. 1, p. 289-292, 2004.

HELMAN, R.G. & OLIVER, J. Pythiosis of the digestive tract in dogs from Oklahoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 35, n. 2, p. 111-114, 1999.

HNILICA, K.A. Difficult dermatologic diagnosis. Pythiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 212, n. 8, p. 1192-1193, 1998.

HOWERTH, E.W.; BROWN, C.C.; CROWDER, C. Subcutaneous pythiosis in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, p. 81-83, 1989.

HUBERT, J.D. & GROOTERS, A.M. Treatment of equine pythiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 24, n. 10, p. 812-815, 2002.

HURTADO, F.K. et al. Liquid-liquid extraction followed by HPLC for the simultaneous analysis of itraconazole and terbinafine in rabbit plasma. In: **CIFARP 2009: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences**, Ribeirão Preto, SP, Abstracts, 2009.

HYNNINEN, V.V. et al. Effects of the antifungals voriconazole and fluconazole on the pharmacokinetics of s-(+)- and R-(-)-Ibuprofen. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, p. 1967-1972, 2006.

IMWIDTHAYA, P. & SRIMUANG, S. Immunodiffusion test for diagnosing human pythiosis. **Mycopathologia**. v. 106, p. 109-112, 1989.

IMWIDTHAYA, P. Systemic fungal infections in Thailand. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 32, p. 395-399, 1994a.

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

IMWIDTHAYA, P. Mycotic keratitis in Thailand. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**. v. 33, p. 81-82, 1995.

JAEGER, G.H.; ROTSTEIN, D.S.; LAW, J.M. Prostatic pythiosis in a dog. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 16, p. 598-602, 2002.

JOHNSON, M.D. et al. Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

JORGE, P.A.R. et al. Efeitos da Atorvastatina, Fluvastatina, Pravastatina e Simvastatina Sobre a Função Endotelial, a Peroxidação Lipídica e a Aterosclerose Aórtica em Coelhos Hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 84, n. 4, p. 314-319, 2005.

KARTSONIS, A.A.; NIELSEN, J.; DOUGLAS, A.M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug Resistance Updates**. v. 6, p. 197-218, 2003.

KOWALSKY, S.F. & DIXON, D.M. Fluconazole: A new antifungal agent. **Clinical Pharmacy**. v. 10, p. 179-194, 1991.

KRAJAEJUN, T. et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clinical Diagnostic Laboratory of Immunology**. v. 9, n. 2, p. 378-382, 2002.

KRAJAEJUN, T. et al. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? **American Journal of Ophthalmology**. v. 137, n. 2, p. 370-372, 2004.

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

KWON-CHUNG, K.J. Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Diseases**, Suppl 1: 1-7, 1994.

LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. **Vascular**. v. 17, p. 234-238, 2009.

LARSSON, C.E. et al. Pitiose canina – Aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL e CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXV, XIII, II, 1997, Gramado. **Anais...**, Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997, p.155.

LEAL, A.T. et al. Pitiose equina com envolvimento de linfonodos. In: JORNADA DE PESQUISA, EXTENSÃO E ENSINO, IV, 1997, Santa Maria. **Anais ...**, Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1997, p. 729.

LEAL, A.B.M. et al. Pitiose equina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 21, n. 4, p. 151-156, 2001a.

LEAL, A.T. et al. Pitiose – Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**. v.31, n. 4, p. 735-743, 2001b.

LEAL, A.T. et al. Resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium insidiosum* associados a diferentes adjuvantes. **Ciência Rural**. v. 32, n. 6, p. 1027-1032, 2002.

LETSCHER-BRU, V. & HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 51, p. 513-521, 2003.

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.

LITTLE, C.B. & KABAY, M.J. Fungal granuloma in a horse. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 298-300, 1984.

LÜBECK, I. et al. Desenvolvimento de um teste de Dot-blot modificado. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA, XIV, 1999, Santa Maria. **Anais ...**, Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1999, p. 609

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

MASCHMEYER, G. & GLASMACHER, A. Pharmacological properties and clinical efficacy of a recently licensed systemic antifungal, caspofungin. **Mycoses**. v. 48, p. 227-234, 2005.

MCMULLAN, W.C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 170, p. 1293-1297, 1977.

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

MELETIADIS, J. et al. In vitro drug interaction modelling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, p. 106-117, 2003.

MENDONZA, L.; KAUFMAN, L.; STANDARD, P.G. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 23, n. 5, p. 813-816, 1986.

MENDOZA, L. & ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**. v. 94, p. 123-129, 1986.

MENDONZA, L.; KAUFMAN, L.; STANDARD, P.G. Antigenic relationship between animal and human pathogen *Pythium insidiosum* and nonpathogenic *Pythium* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 11, p. 2159-2162, 1987.

MENDONZA, L. Pitiosis: Una revisión. **Revista Ibérica de Micología**. v. 4, p. 159-175, 1987.

MENDONZA, L. & PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**. v. 104, p. 59-62, 1988.

MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosum in horses. **Mycopathologia**. v. 119, p. 89-95, 1992a.

MENDOZA, L.; NICHOLSON, V.; PRESCOTT, J.F. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, n.11, p. 2980-2983, 1992b.

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. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, n.6, p. 715-718, 1997.

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, p. 2797-2804, 2003.

MENDONZA, L. & NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**. v. 43, p. 477-486, 2005.

MENDONZA, L. et al. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. **Mycopathologia**. v. 159, p. 219-222, 2005.

MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**. v. 57, p. 377-382, 1981.

MILLER, R.I. & CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, p. 221-226, 1982a.

MILLER, R.I. & CAMPBELL, R.S.F. Immunological studies on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, p. 227-231, 1982b.

MILLER, R. I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**. v. 81, p. 23-28, 1983.

MILLER, R.I.; QUALLS, C. W.; TURNWALD, G. H. Gastrointestinal phycomycosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 182, n. 11, p. 1245-1246, 1983.

MILLER, R.I. & CAMPBELL, R.S.F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**. v. 21, p. 331-341, 1983a.

MILLER R.I. & CAMPBELL R.S.F. Hematology of horses with phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 60, p. 28-29, 1983b.

MILLER, R. I. & CAMPBELL, R.S.F. The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. **Veterinary Pathology**. v. 21, p. 325-332, 1984.

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.

MILLER, R.I. Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 186, p. 473-478, 1985.

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

MOORE, C.B.; WALLS, C.M.; DENNING, D.W. In vitro activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, p. 1882–1885, 2001.

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

MURRAY, D.R. et al. Metastatic phycomycosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 172, n. 7, p. 834-836, 1978.

NASH, J.D.; BURGESS, D.S.; TALBERT, R.L. Effect of fluvastatina and provastatin, HMG-CoA reductase inhibitors, on fluconazole activity against *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**. v.51, p. 105-109, 2002.

N'DIAYE, B. et al. Clinical efficacy and safety of oral terbinafina in fungal mycetoma. **International Journal of Dermatology**. v. 45, p. 154-157, 2006.

NEWTON, J.C. & ROSS, P.S. Equine pythiosis: an overview of immunotherapy. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 15, n. 3, p. 491-493. 1993.

NYILASI, I. et al. In vitro interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. **Journal of Medical Microbiology**. v. 59, p. 200–205, 2010.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, p. 1, 2003.

PECQUET-GOAD, M.E. Pulmonary pythiosis in a horse. **Veterinary Pathology**. v. 21, p. 261-262, 1984.

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.

PEREIRA, D.I.B. et al. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**. v. 38, n. 1, p. 143-147, 2008.

PEREIRA, D.I.B. **Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Pythium insidiosum***: Estudo comparativo entre acetato de caspofungina e imunoterapia em coelhos. 2008. 118 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

PERLIN, D.S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**. v. 10, p. 121–130, 2007.

PESAVENTO, P.A. et al. Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Veterinary Pathology**. v. 45, p. 538–541, 2008.

PINA-VAZ, C. et al. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 678–685, 2005.

PINTO, A.M. et al. Padronização de um teste de ELISA para pitiose. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA, XIV, 1999, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1999, p. 695.

PURCELL, K. L. et al. Jejunal obstruction caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 205, n. 2, p. 337-339, 1994.

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

QIAO, J. et al. Antifungal activity of statins against *Aspergillus* species. **Medical Mycology**. v. 45, p. 589–593, 2007.

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

RAVISHANKAR, J.P. et al. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 34, p. 161-175, 2001.

RECH, R. R.; GRAÇA, D.L.; BARROS, C.L.S. Pitiose em um cão: Relato de caso e diagnóstico diferenciais. **Clínica Veterinária**. v. 50, p. 68-72, 2004.

REIS, J.L. et al. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**. v. 96, p. 289-295, 2003.

RIET-CORREA, F. et al. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico-UFPEL**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 1998, 55 p.

RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Disease**. v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.

RODRIGUES, C.A. & LUVIZOTTO, M.C.R. Zigomicose e pitiose cutânea em equinos: diagnóstico e tratamento. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**. v. 3, n. 3, p. 03-11, 2000.

RODRIGUES, A. et al. Intestinal dog pythiosis in Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 16, p. 37-41, 2006.

ROSA, P.S.; NEWTON, J.C.; TRICHE, P. An ELISA teste to detect *Pythium insidiosum* infection in horses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XX, 1999, Salvador, BA. **Anais...**, Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p. 151.

RYDER, N.S.; WAGNER, S.; LEITNER, I. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 1057-1061, 1998.

SALLIS, E.S.V.; PEREIRA, D.I.B.; RAFFI, M.B. Pitiose cutânea em equinos: 14 casos. **Ciência Rural**. v. 33, n. 5, p. 899-903, 2003.

SANAVRIA, A. et al. Pitiose em equinos: Relato de cinco casos no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 22, n. 4, p. 170-172, 2000.

SANTOS, M. N. & LONDERO, A. T. Zigomicose subcutânea em cavalos, **Pesquisas Agropecuárias Brasileiras-Série Veterinária**. v. 9, p. 7-8, 1974.

SANTOS, M.N. et al. Pitiose cutânea em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 7, p. 57-61, 1987.

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

SANTURIO, J.M; LEAL, A.T.; MONTEIRO, A.B. Pythiose. In: LEFEVRE, P.C ; BLANCOU, J. ; CHERMETTE, R. **Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires du Bétail – Europe et Régions Chaudes**. Paris: Editions TEC & DOC et Editions Médicales Internationales, 1231-1241, 2003a.

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

SANTURIO, J.M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006.

SANTURIO, J.M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **The Veterinary Record**. v. 163, n. 9, p. 276-277, 2008.

SATHAPATAYAVONGS, B. et al. Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.

SCHURKO, A.M. et al. 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.

SEDRISH, S.A. et al. Adjunctive use of a neodymium:yttrium-aluminum garnet laser for treatment of pythiosis granulomas in two horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 211, n. 4, p. 464-465, 1997.

SEKHON, A.S.; PADHYE, A.A.; GARG, A.K. *In vitro* sensitivity of *Penicillium marneffeii* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. **European Journal of Epidemiology**. v. 8, n. 3, p. 427-432, 1992.

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

SILVA, R.A.M.S. et al. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 60, p. 167-171, 1995.

SILVA, P. Fármacos antifúngicos. In: P. Silva (ed.), **Farmacologia**, 7th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2006, p. 1072-1074.

- SMITH, J.B. et al. Canine pythiosis-isolation and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, p. 295-298, 1989.
- SÓCZÓ, G. et al. *In Vitro* Study of *Candida tropicalis* Isolates Exhibiting Paradoxical Growth in the Presence of High Concentrations of Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, p. 4474–4476, 2007.
- SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- STEVENS, D.A.; ESPIRITU, M.; PARMAR, R. Paradoxical Effect of Caspofungin: Reduced Activity against *Candida albicans* at High Drug Concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, p. 3407–3411, 2004.
- STEVENS, D.A. et al. Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 51, p. 173–178, 2005.
- SUDJARITRUK, T. & SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases**. v. 11, p. 1-4, 2011.
- TABOSA, I. M. et al. Pitiose cutânea em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 51, p 27-30, 1999.
- TABOSA, I.M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Veterinary Pathology**. v. 41, p. 412-415, 2004.
- THITITHANYANONT, A. et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Disease**. v. 27, n.6, p. 1394-1400, 1998.
- THOMAS, R & LEWIS, D. Pythiosis. **Selecciones Veterinarias**. v. 8, n. 3, p. 313-319, 1998.
- TRISCOTT, J. A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.
- TÚRY, E. & CORÔA A.C. Pitiose cutânea em equinos no Estado do Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXV, 1997, Gramado. **Annais...**Gramado: 1997, p.150.
- VANITTANAKOM, N. et al. Identification of emerging human–pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 9, p. 3970-3974, 2004.

VAZQUEZ, J.A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier – are we there yet? **Medical Mycology**. v. 41, p. 355-368, 2003.

WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**. v. 22, p. 3613-3621, 2004.

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.

ZHU, L.; GIL-LAMAIGNERE, C.; MÜLLER, F.C. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. **Mycoses**. v. 47, p. 319–325, 2004.