

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES  
ANTIMICROBIANAS DO DISSELENETO DE  
DIFENILA E DA ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS  
ANTIFÚNGICOS CONTRA *Pythium insidiosum* E  
FUNGOS PATOGÊNICOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Érico Silva de Loreto**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS  
DO DISSELENETO DE DIFENILA E DA ASSOCIAÇÃO DE  
FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS CONTRA *Pythium insidiosum* E  
FUNGOS PATOGÊNICOS**

**por**

**Érico Silva de Loreto**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica,  
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial  
para obtenção do grau de  
**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Prof. Dr. Gilzon Zeni**

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO  
DISSELENETO DE DIFENILA E DA ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS  
ANTIFÚNGICOS CONTRA *Pythium insidiosum* E FUNGOS  
PATOGENICOS**

elaborada por  
**Érico Silva de Loreto**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO ORGANIZADORA:**

---

**Gilson Zeni, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Laerte Ferreira, Dr. (UFRGS)**

---

**Melissa Orzechowski Xavier, Dr<sup>a</sup>. (FURG)**

---

**Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 21 de maio de 2010.

## **Agradecimentos**

Agradeço pela presença e incentivo de minha família, os quais são a motivação para todas as conquistas. Meus pais queridos e amados, obrigado pelo sacrifício diário para a paz e o sucesso de todos nós; as vitórias não seriam possíveis sem o carinho, amor e dedicação de vocês.

Minha amada esposa Juliana, teu amor, força e nossa vitória são motivos de uma felicidade indescritível. Teu carinho e dedicação foram essenciais nesta conquista.

Aos professores Cristina e Gilson pelo apoio para a realização deste trabalho. A dedicação, seriedade e paixão pela ciência que vocês transpiram tem caráter exemplar. Obrigado pela atenção que sempre recebi em todos nossos encontros.

Aos professores Sydney e Janio, grandes mentores, pela ajuda indispensável e pelo ensino da paixão pela micologia.

Aos colegas dos laboratórios da Bioquímica e do Lapemi. Sou grato pela ajuda e presteza que sempre recebi de todos.

Agradeço aos chefes e colegas do HGuSM pela amizade, apoio e compreensão em todos estes anos de convívio.

À professora Ione Denardin, pela ajuda recebida no setor de Cunicultura.

À todos amigos e instituições que durante esta pesquisa foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO DISSELENETO DE DIFENILA E DA ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS CONTRA *Pythium insidiosum* E FUNGOS PATOGENICOS**

AUTOR: ÉRICO SILVA DE LORETO

ORIENTADOR: GILSON ZENI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de maio de 2010

A crescente incidência de infecções microbianas associada com o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos e insucesso terapêutico incentiva a pesquisa de novas alternativas para a profilaxia e tratamento das infecções causadas por microrganismos. Neste contexto, esta tese teve como objetivos avaliar as propriedades antimicrobianas do disseleneto de difenila ((PhSe)<sub>2</sub>), seus análogos estruturais com grupos funcionais contendo cloro, fluor e metoxil, bem como a associação de fármacos antifúngicos contra espécies patogênicas de fungos e *Pythium insidiosum* em testes *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, a utilização de novos meios de culturas na indução da zoosporogênese e da conservação de *P. insidiosum* foi avaliada. Através de teste de suscetibilidade baseado no protocolo M38-A2 do CLSI, com inóculo formado por zoósporos de *P. insidiosum*, pode-se observar que o (PhSe)<sub>2</sub> apresentou atividade fungicida *in vitro* contra *P. insidiosum*, com concentração fungicida mínima (CFM) variando de 0,5 a 4 µg/mL e sugere-se uma atividade fungistática *in vivo* no tratamento com 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub> na pitiose experimental em coelhos. A avaliação laboratorial bioquímica e hematológica deste tratamento experimental não evidenciou características de toxicidade na administração oral do (PhSe)<sub>2</sub>. A avaliação dos testes de suscetibilidade *in vitro* para fungos leveduriformes e filamentosos foi baseada nos protocolos M27-A3 e M38-A2 do CLSI e evidenciou que o (PhSe)<sub>2</sub> apresentou atividade fungistática e fungicida contra diversas espécies fúngicas, incluindo *Candida albicans* (CFM de 8 a 32 µg/mL), *Aspergillus fumigatus* (CFM de 16 a >64 µg/mL) e *Fusarium solani* (CFM de 8 a 64 µg/mL). A introdução de grupos funcionais na molécula do (PhSe)<sub>2</sub> produziu uma diminuição ou perda da atividade antifúngica, sendo (PhSe)<sub>2</sub> > (*p*-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub> > (*m*-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub> > (*p*-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub>. O tratamento da pitiose experimental em coelhos foi conduzido também com a terapia combinada de antifúngicos. Neste contexto, a associação de fluconazol (100 mg/Kg/dia) + fluvastatina (1 mg/Kg/dia) + terbinafina (100 mg/Kg/dia) foi a única terapia, dentre as testadas, que resultou na cura clínica de um coelho e uma possível atividade fungistática nos demais animais do grupo. A avaliação laboratorial deste tratamento sugere um envolvimento do metabolismo do ferro, em vista de diferentes níveis de saturação da transferrina, no desenvolvimento da pitiose. Adicionalmente, a avaliação de novos protocolos para a indução da zoosporogênese *in vitro* evidenciou que a subcultura sequencial de *P. insidiosum* em meios nutricionalmente ricos (ágar chocolate e ágar gema) e pobres (ágar extrato de levedura 0,2% e ágar fubá) proporcionou a recuperação e estimulação da produção de zoósporos *in vitro*, os quais são essenciais para a identificação, testes de suscetibilidade e indução da infecção experimental em coelhos. A conservação de isolados de *P. insidiosum* em tubos contendo água e pedaços de grama estéreis proporcionam um ambiente favorável para a manutenção da viabilidade desta espécie por longos períodos.

**Palavras-chave:** disseleneto de difenila, atividade antifúngica, terapia antifúngica combinada, *Pythium insidiosum*, zoosporogênese.

## ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF DIPHENYL DISELENIDE AND ANTIFUNGAL COMBINATION AGAINST *Pythium insidiosum* AND PATHOGENIC FUNGI

AUTHOR: ÉRICO SILVA DE LORETO

ADVISER: GILSON ZENI

Date and Location of Defense: Santa Maria, May 21, 2010

The increasing incidence of microbial infections associated with the development of antimicrobial resistance and treatment failure encourages the research for new alternatives for prophylaxis and treatment of infections caused by microorganisms. In this context, this thesis aimed to evaluate the antimicrobial properties of diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>), its structural analogues with functional groups containing chlorine, fluorine and methoxyl as well as the combination of antifungal drugs against pathogenic fungi and *Pythium insidiosum* in tests *in vitro* and *in vivo*. Additionally, the use of new culture media in the induction of zoosporogenesis and conservation of *P. insidiosum* has been assessed. Through the susceptibility tests based on the protocol M38-A2 of CLSI, with inoculum consisting of zoospores of *P. insidiosum*, can be observed that (PhSe)<sub>2</sub> showed *in vitro* antifungal activity against *P. insidiosum*, with the minimum fungicidal concentration (MFC) ranging from 0.5 to 4 µg/mL and suggested a fungistatic activity *in vivo* treatment with 10 mg/Kg/day of (PhSe)<sub>2</sub> in experimental pythiosis in rabbits. The biochemical and hematological laboratory evaluation of this experimental treatment showed no toxic characteristics of oral administration of (PhSe)<sub>2</sub>. The evaluation of *in vitro* susceptibility testing for yeast and filamentous fungi was based on protocols M27-A3 and M38-A2 of CLSI and indicated that (PhSe)<sub>2</sub> showed fungistatic and fungicidal activity against several fungal species, including *Candida albicans* (MFC 8 to 32 µg/mL), *Aspergillus fumigatus* (MFC 16 to >64 µg/mL) and *Fusarium solani* (MFC 8 to 64 µg/mL). The introduction of functional groups in the molecule of (PhSe)<sub>2</sub> produced a decrease or loss of antifungal activity, being (PhSe)<sub>2</sub> > (*p*-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub> > (*m*-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub> > (*p*-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub>. Treatment of experimental pythiosis in rabbits was also conducted with the combined therapy with antifungal agents. In this context, the combination therapy of fluconazole (100 mg/Kg/day) + terbinafin (100 mg/Kg/day) + fluvastatin (1 mg/Kg/day) was the only one among the tested, which resulted in clinical cure of one rabbit and a possible fungistatic activity in other animals of this group. The laboratory evaluation of this treatment suggests the involvement of iron metabolism in view of different levels of transferrin saturation in the develop of pythiosis. Additionally, the evaluation of new protocols for the induction of zoosporogenesis *in vitro* showed that the sequential subculture of *P. insidiosum* in nutritionally rich (chocolate agar and egg yolk agar) and poor (0.2% yeast extract agar and cornmeal agar) media provides a recovery and stimulation of *in vitro* production of zoospores, which are essential for identification, susceptibility testing and induction of experimental infection in rabbits. The conservation of isolates of *P. insidiosum* in tubes containing sterile water and pieces of grass provide a favorable environment for the viability of this species for long periods.

**Keywords:** diphenyl diselenide, antifungal activity, antifungal combination therapy, *Pythium insidiosum*, zoosporogenesis.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades farmacológicas do disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> .....	15
Tabela 2 - Interações <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> entre compostos antifúngicos. ....	21
<b>Manuscrito 1</b>	
Tabela 1 - Teste de suscetibilidade dos 19 isolados de <i>Pythium insidiosum</i> frente ao disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> .....	40
Tabela 2- Perfil bioquímicos dos coelhos com pitiose experimental e/ou tratados com disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e controles.....	40
Tabela 3 - Perfil hematológico dos coelhos com pitiose experimental e/ou tratados com disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e controles.....	41
<b>Manuscrito 2</b>	
Table 1. Initial screening of diphenyl diselenide as an antifungal agent <i>in vitro</i> . ....	57
Table 2. <i>In vitro</i> susceptibilities of yeast and filamentous fungi to diphenyl diselenide and its synthetic analogs. ....	57
<b>Manuscrito 3</b>	
Table 1 – Serum levels of the biochemical markers and hematological parameters of rabbits with subcutaneous pythiosis. ....	69
<b>Manuscrito 4</b>	
Table 1 - Zoosporogenesis protocols.....	83
Table 2. Comparison of zoosporogenesis using CHO or EYA followed the protocol 5.....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do disseleneto de difenila .....	14
Figura 2 - Estrutura química dos análogos estruturais do disseleneto de difenila.....	16
Figura 3 - Sítios de ação dos antifúngicos .....	17
Figura 4 - A, pitiose cutânea na extremidade distal de equino; B, pitiose cutânea e gastrointestinal em um labrador, com lesão delimitada, ulcerativa e área alopecica; C, pitiose orbital - cura clínica com enucleação cirúrgica do globo ocular; D, pitiose em membro inferior com arterite ascendente necrótica em paciente talassêmico, trabalhador em estrebaria; tratamento com amputação do membro inferior acima do joelho .....	28
<b>Manuscrito 1</b>	
Figura 1 - Estrutura do disseleneto de difenila .....	42
Figura 2 - Variação percentual do tamanho das lesões (área nodular) dos coelhos inoculados experimentalmente com zoósporos de <i>Pythium insidiosum</i> e tratados com disseleneto de difenila (10 mg/Kg/dia (grupo 1) e com óleo de canola (grupo 2, controle).....	42
<b>Manuscrito 2</b>	
Figure 1. Chemical structures of disubstituted diaryl diselenides .....	58
<b>Manuscrito 3</b>	
Figure 1 - Percentage variation of lesions size in rabbits inoculated experimentally with <i>Pythium insidiosum</i> zoospores and receiving combination antifungal therapy.....	68
<b>Manuscrito 4</b>	
Figure 1 - Zoospores count in different protocols .....	83



## LISTA DE ABREVIACOES

**(PhSe)<sub>2</sub>** - Disseleneto de difenila  
**ANOVA** - Análise de variância  
**ATB** - Antibiograma  
**CFM** - Concentração fungicida mínima  
**CIM** - Concentração inibitória mínima  
**CLSI** - *Clinical and Laboratory Standards Institutes*  
**DL<sub>50</sub>** - A dose que provoca a morte de pelo menos 50% da população em estudo  
**DNA** - cido desoxirribonucleico  
**ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
**GC** - Cromatografia gasosa  
**GSH** - Glutathiona  
**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência  
**Kg** - quilo  
**LDL** - *Low Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de baixa densidade)  
**MFC** = *ver CFM*  
**MG** - Média geométrica  
**mg** - miligrama  
**MHz** - Mega-hertz  
**MIC** = *ver CIM*  
**mL** - mililitros  
**NMR** - Ressonância magnética nuclear  
**OS** - Organocompostos de selênio  
**ppm** - Partes por milhão  
**SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
**TSA** - Teste de suscetibilidade aos antifúngicos  
**WB** - *Western blot*  
**-ALA-D** - cido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase  
**g** - micrograma

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Disseleneto de difenila e análogos estruturais.....	14
2.1.1. Disseleneto de difenila .....	14
2.1.2. Análogos estruturais do disseleneto de difenila .....	16
2.2. Compostos Antifúngicos .....	17
2.2.1. Fármacos antifúngicos.....	17
2.2.2. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos.....	18
2.2.3. Mecanismo de resistência aos antifúngicos.....	19
2.2.4. Associação de compostos antifúngicos .....	20
2.2.5. Compostos orgânicos de selênio com ação antifúngica .....	22
2.3. Infecções Fúngicas .....	23
2.3.1. Classificação geral dos fungos .....	23
2.3.2. Epidemiologia das infecções fúngicas.....	24
2.4. Pitiose .....	25
2.4.1. Epidemiologia.....	25
2.4.2. Manifestações clínicas.....	26
2.4.3. Diagnóstico.....	26
2.4.4. Tratamento.....	28
3. Objetivos.....	30

3.1. Objetivo geral .....	30
3.2. Objetivos específicos .....	30
4. Manuscritos .....	31
4.1. Atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do disseleneto de difenila contra <i>Pythium insidiosum</i> .....	32
4.2. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica e relação estrutura-atividade do disseleneto de difenila e sintéticos análogos .....	45
4.3. Terapia antifúngica associada e parâmetros laboratoriais na pitiose.....	59
4.4. Zoosporogênese e conservação de <i>Pythium insidiosum</i> .....	70
5. DISCUSSÃO .....	84
6. CONCLUSÕES .....	87
7. PERSPECTIVAS .....	88
7.1. Indução de pitiose experimental em camundongos com sobrecarga de ferro .....	88
7.1.1. Objetivos.....	88
8. BIBLIOGRAFIA .....	89

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta, nos últimos séculos, do papel dos microrganismos como agentes de patologias em animais e plantas desencadeou uma progressiva e constante busca por compostos de origem natural provenientes de plantas e microrganismos, e da síntese de novas estruturas químicas capazes de combater infecções com o mínimo de efeitos tóxicos para o hospedeiro.

Apesar dos grandes avanços na tecnologia e da compreensão das inter-relações entre patógenos e hospedeiros, a descoberta de novos fármacos permanece um processo longo, dispendioso, difícil e muitas vezes desorientado, com a procura "cega" das propriedades farmacológicas de "novos" compostos químicos, sendo que atualmente os custos da pesquisa e desenvolvimento de cada novo fármaco podem ser estimados em aproximadamente 1,8 bilhão de dólares (Anson *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010).

Os organocompostos de selênio (OS) são substâncias bem conhecidas desde 1847, quando Wöhler e Siemens relataram a primeira síntese do etil-selenol. Desde então, diversas possibilidades da utilização destes compostos na química orgânica foram descritos, como extensamente abordado por Wirth, 2000. No entanto, a crescente descrição das propriedades farmacológicas desta classe de compostos, tais como antioxidantes, inibidores enzimáticos, neuroprotetores, agentes anti-tumorais e anti-infecciosos e imunomoduladores (Mugesh *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2004) incentiva a pesquisa de novas propriedades farmacológicas dos compostos atualmente utilizados e da síntese orientada de novas estruturas químicas.

O disseleneto de difenila é um OS simples que tem sido foco de pesquisas que descrevem o potencial farmacológico que este composto apresenta em diversos modelos biológicos, como revisado por Rosa *et al.*, 2007b, fazendo com que este composto seja um bom candidato em propostas terapêuticas devido às suas atividades antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antiúlcera e hepatoprotetora já descritas.

A frequência das infecções fúngicas invasivas aumentou significativamente nas últimas duas décadas, com excessiva morbidade e mortalidade, estando diretamente correlacionada com o crescente aumento de pacientes com fatores de risco para desenvolver infecções fúngicas, tais como em transplantes, procedimentos cirúrgicos agressivos, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), neoplasias, terapias imunossupressoras e neonatos prematuros (Pfaller *et al.*, 2006b).

Adicionalmente, a pesquisa de fármacos antifúngicos permanece em atraso quando comparado com o desenvolvimento de fármacos antibacterianos, com poucas classes de

fármacos antifúngicos disponíveis. Pacientes com infecções fúngicas invasivas requerem um tempo de internação prolongado e os custos da terapia antifúngica, dependendo do hospital, podem variar de 144 euros/dia, nos casos de candidemias causadas por espécies de *Candida* sensíveis, até 478 euros/dia, nos casos de espécies resistentes (Vandijck *et al.*, 2008).

A epidemiologia das infecções fúngicas sofreu alterações notáveis desde a década de 1980. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* representavam as espécies associadas como agentes de infecções fúngicas na grande maioria dos casos. Atualmente, outros fungos, tais como *Candida* não-*albicans*, *Aspergillus* não-*fumigatus*, zigomicetos, *Fusarium* spp. e agente de feohifomicoses, destacam-se como importantes causas de infecções oportunistas emergentes e apresentam taxas de mortalidade preocupantes (Idemyor, 2003; Garnica e Nucci, 2009).

Embora não classificado como um fungo, os casos de pitiose, causado pelo oomiceto *Pythium insidiosum*, vem chamando a atenção na micologia pelas similaridades fisiológicas e morfológicas que esta espécie compartilha com fungos, pela severidade da doença em mamíferos (fatal se não tratado) e pelo insucesso terapêutico nos tratamentos com antifúngicos. A maioria dos casos de pitiose foram descritos em equinos e caninos, com lesões subcutâneas piogranulomatosas e ulcerativas. Em humanos a doença caracteriza-se por ceratite, arterite e infecções disseminadas. Embora a imunoterapia apresente bons resultados em casos iniciais da doença, a remoção cirúrgica das lesões associado com terapia antifúngica complementar, representa a principal opção nos casos não responsivos ao tratamento quimioterápico (Santurio e Ferreiro, 2008).

*Pythium insidiosum* se desenvolve em áreas pantanosas, com ciclo biológico baseado na colonização de plantas aquáticas, as quais servem de substrato para o crescimento vegetativo miceliano e formação assexuada de zoósporos biflagelados móveis. Os zoósporos podem ser obtidas *in vitro*, utilizando a técnica de zoosporogênese em meio líquido e representam passo necessário para a identificação (Bentinck-Smith *et al.*, 1989), testes de susceptibilidade *in vitro* (Pereira *et al.*, 2007; Argenta *et al.*, 2008; Cavalheiro *et al.*, 2009b) e reprodução experimental da doença em coelhos (Santurio *et al.*, 2003). No entanto, isolados mantidos por longos períodos de tempo sob ciclos de subculturas podem perder a capacidade de produzir zoósporos *in vitro* e/ou a viabilidade de crescimento (Pereira *et al.*, 2008).

Diante deste contexto, o presente trabalho avaliou: a) a atividade antifúngica *in vitro* do disseleneto de difenila e análogos estruturais contra fungos reconhecidos como patógenos para humanos e animais; b) a atividade *in vitro* do disseleneto de difenila contra *Pythium insidiosum* e *in vivo* no tratamento da pitiose experimental em coelhos; c) a associação de

fármacos antifúngicos na tratamento da pitiose experimental em coelhos; d) a recuperação/estimulação da zoosporogênese *in vitro* de *Pythium insidiosum*, assim como sua conservação por períodos prolongados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Disseleneto de difenila e análogos estruturais

#### 2.1.1. Disseleneto de difenila

Os avanços na área de síntese e reatividade de organocompostos de selênio (OS), a descoberta de que o selênio é um oligoelemento essencial na dieta (Rayman, 2000) e que moléculas contendo selênio podem ser melhor nucleófilos (e portanto, antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos, incentivaram o aumento do interesse na síntese de novos OS (Arteel e Sies, 2001). Como resultado, intensos estudos sobre as propriedades biológicas dos OS têm sido desenvolvidos, revelando que estas moléculas podem ser utilizadas como antioxidantes, inibidores enzimáticos, neuroprotetores, anti-tumorais, anti-infecciosos, indutores de citocinas e imunomoduladores (Nogueira *et al.*, 2004; Narajji *et al.*, 2007).

O disseleneto de difenila ( $\text{PhSe}_2$ ) (Figura 1) é um OS simples, estável e altamente lipofílico, amplamente utilizado como intermediário em sínteses orgânicas (Wirth, 2000) que reage de forma muito eficaz com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos. A reação é semelhante àquela catalisada pela enzima glutathione peroxidase (Nogueira *et al.*, 2004). Extensivos estudos têm sido focados sobre os efeitos toxicológicos e farmacológicos do  $(\text{PhSe})_2$  em diferentes modelos biológicos, como revisado por Rosa *et al.*, 2007b, fazendo com que este composto seja um bom candidato em propostas terapêuticas. Entre as principais propriedades farmacológicas, destacam-se as atividades antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antiúlcera e hepatoprotetora (Tabela 1).

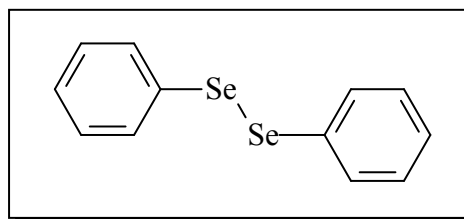


Figura 1 - Estrutura química do disseleneto de difenila

Com relação à toxicidade, altas doses de  $(\text{PhSe})_2$  têm demonstrado danos ao sistema nervoso central de camundongos, causando diminuição da transmissão glutamatérgica, bem como toxicidade hepática e renal (Meotti *et al.*, 2003; Prigol *et al.*, 2008), com efeitos mais

tóxicos quando administrado por via intraperitoneal do que subcutânea (Meotti *et al.*, 2003). Em modelos experimentais de toxicidade geral, a administração via oral por tempo prolongado de 0,3 a 30 ppm de (PhSe)<sub>2</sub> demonstra baixa toxicidade em coelhos (De Bem *et al.*, 2006; De Bem *et al.*, 2007) e a administração aguda de doses supra-farmacológicas (10 a 100 mg/Kg) mostrou que a dose de (PhSe)<sub>2</sub> que causa a mortalidade de 50% de camundongos (DL<sub>50</sub>) está estimada como sendo superior a 312 mg/Kg. Portanto, em doses com conhecidos efeitos farmacológicos, o (PhSe)<sub>2</sub> não apresenta efeitos tóxicos nos modelos experimentais avaliados em animais (Savegnago *et al.*, 2007b).

Tabela 1 - Propriedades farmacológicas do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>

<b>Efeito/propriedade</b>	<b>Condições do teste</b>	<b>Referências</b>
Anti-aterogênico	Hipercolesterolemia induzida em coelhos Oxidação <i>in vitro</i> da LDL humana	(De Bem <i>et al.</i> , 2008; De Bem <i>et al.</i> , 2009)
Antigenotóxico, antimutagênico	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade, genotoxicidade e clastogenicidade	(Rosa <i>et al.</i> , 2007a)
Anti-hiperglicêmico	Diabetes mellitus induzida pela aloxana e estreptozotocina em ratos	(Barbosa <i>et al.</i> , 2008b)
Anti-inflamatória, antinociceptiva	Modelos de nocicepção e dor em ratos e camundongos	(Nogueira <i>et al.</i> , 2003; Zasso <i>et al.</i> , 2005; Savegnago <i>et al.</i> , 2007b; Savegnago <i>et al.</i> , 2007c; Savegnago <i>et al.</i> , 2008a; Savegnago <i>et al.</i> , 2008c)
Antidepressor	Estado depressivo induzido em ratos	(Savegnago <i>et al.</i> , 2007a; Savegnago <i>et al.</i> , 2008b; Acker <i>et al.</i> , 2009)
Antioxidante	Estresse oxidativo induzido <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em camundongos e ratos	(Posser <i>et al.</i> , 2006; Luchese <i>et al.</i> , 2007a; Luchese <i>et al.</i> , 2007b; Puntel <i>et al.</i> , 2007; Barbosa <i>et al.</i> , 2008c; Freitas <i>et al.</i> , 2009; Hassan <i>et al.</i> , 2009; Kade <i>et al.</i> , 2009; Luchese <i>et al.</i> , 2009; Prigol <i>et al.</i> , 2009c; Stangherlin <i>et al.</i> , 2009)
Anti-secretor, antiúlcera	Lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina em ratos	(Savegnago <i>et al.</i> , 2006; Ineu <i>et al.</i> , 2008)
Ansiolítico	Camundongos e ratos submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro	(Ghisleni <i>et al.</i> , 2008; Savegnago <i>et al.</i> , 2008b)
Antitumoral	Tumor mamário em ratos pela administração de N-nitroso-N-metiluréia	(Barbosa <i>et al.</i> , 2008a)
Hepatoprotetor	Dano hepático induzido por 2-nitropropano, tetracloreto de carbono, cádmio e paracetamol em ratos	(Borges <i>et al.</i> , 2005; Borges <i>et al.</i> , 2006; Borges <i>et al.</i> , 2008; Nogueira <i>et al.</i> , 2009; Wilhelm <i>et al.</i> , 2009a)
Neuroprotetor	Danos ou toxicidade induzida direta ou indireta no cérebro	(Ghisleni <i>et al.</i> , 2003; Burger <i>et al.</i> , 2004; Burger <i>et al.</i> , 2006; Posser <i>et al.</i> , 2008; Prigol <i>et al.</i> , 2008; Brito <i>et al.</i> , 2009)
Proteção toxicidade induzida por metais	Intoxicação por mercúrio e cádmio em ratos e camundongos	(Santos <i>et al.</i> , 2004; Santos <i>et al.</i> , 2005a; Santos <i>et al.</i> , 2005b; Brandao <i>et al.</i> , 2008)



Em modelos experimentais com microrganismos, o  $(\text{PhSe})_2$  foi capaz de induzir mutações de fase de leitura em *Salmonella typhimurium* e *Saccharomyces cerevisiae*, aumentar o *crossing-over* e as frequências de conversão gênica em *S. cerevisiae* (Rosa *et al.*, 2004). O  $(\text{PhSe})_2$  interage não enzimaticamente com o grupo tiol da glutatona (GSH), com a consequente depleção de GSH livre *in vivo* em *S. cerevisiae*, provavelmente através da formação de adutos, reduzindo a defesa celular não enzimática e assim sensibilizando a célula aos danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (atividade pró-oxidante) (Rosa *et al.*, 2005).

### 2.1.2. Análogos estruturais do disseleneto de difenila

Recentemente, alterações estruturais no anel aromático do  $(\text{PhSe})_2$  com a introdução de grupos funcionais foram propostas e avaliações farmacológicas e toxicológicas desenvolvidas (Figura 2). A dose letal ( $\text{DL}_{50}$ ) para camundongos do *p*-cloro disseleneto de difenila ( $p\text{-Cl-C}_6\text{H}_4\text{Se}$ )<sub>2</sub>, do *m*-trifluorometil disseleneto de difenila ( $m\text{-CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{Se}$ )<sub>2</sub> e do *p*-metoxil disseleneto de difenila ( $p\text{-CH}_3\text{O-C}_6\text{H}_4\text{Se}$ )<sub>2</sub> são superiores a 381 mg/Kg, 278 mg/Kg e superiores a 372 mg/Kg, respectivamente (Savegnago *et al.*, 2009). Através de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* foi constatado que, dependendo da dose e das condições testadas, estes  $(\text{PhSe})_2$  substituídos inibem as atividades da  $\delta$ -ALA-D, catalase e  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (Bruning *et al.*, 2009; Savegnago *et al.*, 2009) e inibem a captação de serotonina (Borges *et al.*, 2009).

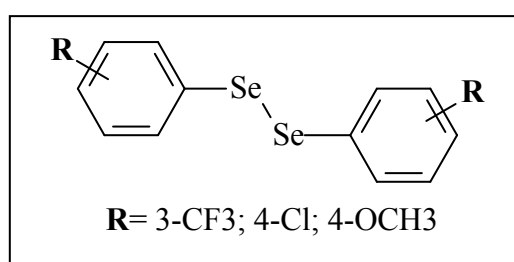


Figura 2 - Estrutura química dos análogos estruturais do disseleneto de difenila

Farmacologicamente, em modelos experimentais, demonstram propriedades antinociceptivas (Pinto *et al.*, 2008; Jesse *et al.*, 2009), proteção do dano oxidativo cerebral induzido pelo nitroprussiato de sódio (Prigol *et al.*, 2009b) e da insuficiência hepática aguda induzida por galactosamina e lipopolissacarídeos (Wilhelm *et al.*, 2009b). A escolha pelo  $(\text{PhSe})_2$  ou um de seus análogos estruturais em propostas terapêuticas parece depender do modelo experimental e do efeito desejado. Em modelos de proteção de dano hepático

induzido por 2-nitropropano, o  $(m\text{-CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{Se})_2$  apresenta maior toxicidade e menor efeito protetor que o  $(\text{PhSe})_2$  (Wilhelm *et al.*, 2009c), enquanto que, em modelos de convulsão o  $(m\text{-CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{Se})_2$  prolonga a latência para o início do primeiro episódio convulsivo e reduz o número de animais que apresentam convulsões mais eficazmente (Prigol *et al.*, 2009a).

## 2.2. Compostos Antifúngicos

### 2.2.1. Fármacos antifúngicos

Comparado com a grande variedade de fármacos e associações antibacterianas, atualmente poucas classes de fármacos antifúngicos estão disponíveis. O desenvolvimento de antibacterianos apresenta vantagens sobre os antifúngicos uma vez que existem múltiplos sítios de ligação e ação nas bactérias que não estão presentes nas células de mamíferos. Por outro lado, os fungos compartilham similaridades com as células de mamíferos, o que dificulta a pesquisa de novos fármacos e sítios de ação. Atualmente, os principais alvos dos antifúngicos são sobre os esteróis da membrana plasmática, na síntese de ácidos nucleicos e sobre os constituintes da parede celular (quitina,  $\beta$ -(1,3)-glucana e manonoproteínas) (Figura 3) (Gubbins e Anaissie, 2009).

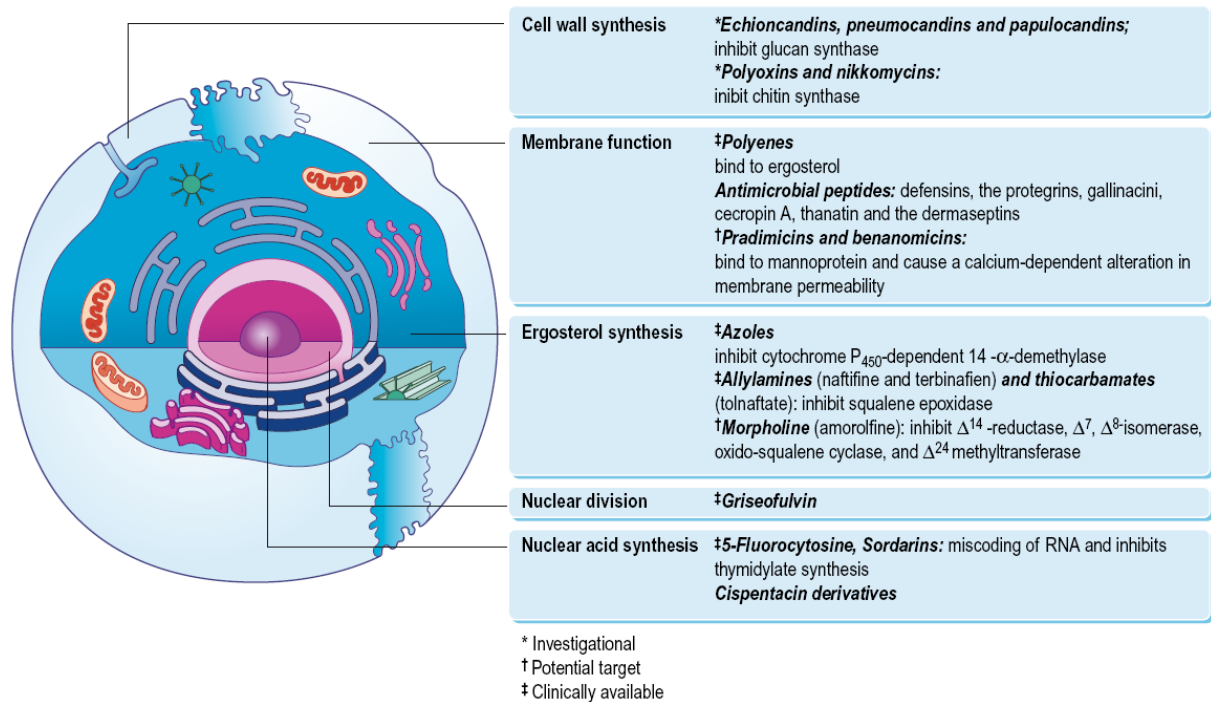


Figura 3 - Sítios de ação dos antifúngicos (adaptado de Gubbins e Anaissie, 2009).

Os fármacos com ação sobre os esteróis (ergosterol) da membrana plasmática incluem os derivados poliênicos (Anfotericina B, Nistatina), azólicos (Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol) e as alilaminas (Terbinafina). Os antifúngicos poliênicos ligam-se diretamente ao ergosterol, formando canais (poros) que aumentam a permeabilidade da membrana, com perda de material citoplasmático, o que pode resultar na morte celular (Drew, 2010b) enquanto que os derivados azólicos e as alilaminas interferem na síntese do ergosterol através da inibição das enzimas C-14- $\alpha$ -demetilase e esqualeno epoxidase, respectivamente, bloqueando etapas precursoras da biossíntese do ergosterol (Ryder, 1992; Ashley, 2010).

A 5-fluorocitosina (5FC), fármaco com ação na síntese de ácidos nucleicos, é transportado para dentro da célula fúngica, onde é convertida à 5-fluorouracil, o qual é um antimetabólico que inibe a síntese de DNA (Drew, 2010a).

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

### 2.2.2. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos

Similar às diferenças observadas no desenvolvimento entre fármacos antibacterianos e antifúngicos, o desenvolvimento dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos (TSA) está distante dos progressos já obtidos com os testes de suscetibilidade aos antibacterianos (ATB) disponíveis. Os TSA recentemente foram padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institutes* (CLSI), com o primeiro protocolo aprovado em 1997 para *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans*, enquanto que o protocolo descrito para o TSA de alguns fungos filamentosos foi aprovado recentemente, em 2002 (Ernst, 2005).

Atualmente, os protocolos aprovados são os testes de disco difusão para leveduras, documento M44-A (Sheehan e Clinical and Laboratory Standards Institute., 2004) e os testes de macro e microdiluição, documentos M38-A2 para fungos filamentosos (Rex e Clinical and Laboratory Standards Institute., 2008a) e para leveduras, documento M27-A3 (Rex e Clinical and Laboratory Standards Institute., 2008b). Outros métodos de TSA incluem o E-test<sup>®</sup> e métodos colorimétricos comerciais, sendo que suas eficiências estão baseadas em estudos de correlação com os métodos do CLSI (Canton *et al.*, 2009; Negri *et al.*, 2009).

A correlação clínica entre os resultados dos TSA e a resposta ao tratamento permanece um desafio. Os TSA podem prever o resultado do tratamento em uma proporção chamada "Regra dos 90-60" (Rex e Pfaller, 2002; Pfaller *et al.*, 2006a). De acordo com esta regra,

infecções devido a isolados fúngicos sensíveis *in vitro* respondem em 90% das vezes à terapia, enquanto que os resistentes *in vitro* respondem em 60%. Ou seja, o TSA é apenas um dos diversos fatores que podem influenciar no sucesso da terapia (Rex e Pfaller, 2002; Alexander e Pfaller, 2006). Além disso, menos de 10 fármacos antifúngicos contra menos de 10 microrganismos fúngicos apresentam *breakpoints* interpretativos que caracterizam a sensibilidade ou a resistência destes fungos à determinada concentração de antifúngico (Rex e Pfaller, 2002; Pfaller *et al.*, 2006a).

### 2.2.3. Mecanismo de resistência aos antifúngicos

A resistência aos antifúngicos poliênicos, embora incomum, vêm chamando a atenção pelo crescente número de relatos de isolados fúngicos exibindo elevada concentração inibitória mínima (CIM) frente à anfotericina B (AmB) (Pfaller e Diekema, 2007). Uma vez que o mecanismo de ação da AmB está diretamente ligado à interação com o ergosterol presente na membrana fúngica, condições que alteram o conteúdo e a composição deste esterol estão associados com o desenvolvimento de resistência (Bossche *et al.*, 1994; Graybill, 1995). Os principais defeitos na biossíntese do ergosterol, analisados em espécies de *Candida*, incluem as mutações nos genes *ERG3*, *ERG5*, *ERG6*, *ERG11* e *ERG 25*, que acarretam na diminuição da produção ergosterol e/ou produção de esteróis anormais (Barker e Rogers, 2006; Vandeputte *et al.*, 2007). A resistência à AmB pode ser obtida *in vitro* através de ciclos de culturas em concentrações crescentes deste fármaco (Barker *et al.*, 2004), estando também associada com alterações oxidativas da célula fúngica como resultado de uma diminuição da respiração aeróbica (Geraghty e Kavanagh, 2003).

A maioria dos estudos sobre a resistência aos antifúngicos azólicos estão baseados na interação de *C. albicans* e fluconazol (Hitchcock, 1993; Maccallum *et al.*, 2010). No entanto, crescentes são os relatos da resistência aos antifúngicos azólicos em outras espécies fúngicas (Nguyen *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 2009). Alterações qualitativas e quantitativas do gene *ERG11*, em *Candida*, podem alterar a rota de biossíntese do ergosterol, resultando na perda de afinidade de enzimas alvo e/ou causar superexpressão do gene, o que resulta em uma superprodução das enzimas alvo e necessidade de uma maior concentração intracelular do antifúngico para ocorrer a inibição de todas as enzimas alvo (Lupetti *et al.*, 2002; Manastir *et al.*, 2009). Outro mecanismo de resistência inclui a presença de proteínas transportadoras (bombas de efluxo) codificadas pelos genes *MDR* ou *CDR*, que expulsam o fármaco para fora da célula (Cannon *et al.*, 2009). A expressão (*upregulation*) do gene *MDR* tem efeito sobre a resistência ao fluconazol, enquanto que a expressão (*upregulation*) do gene *CDR* confere

resistência a diversos antifúngicos azólicos (Kontoyiannis e Lewis, 2002; Lupetti *et al.*, 2002; Cannon *et al.*, 2009).

A flucitosina apresenta um estreito espectro de atividade (principalmente contra *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*) e a monoterapia com esta droga geralmente conduz à resistência clínica (Cuenca-Estrella *et al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2009b). Os mecanismos envolvidos na resistência à flucitosina envolvem alterações nas várias etapas enzimáticas intracelulares envolvidas no mecanismo de ação, incluindo alterações nas enzimas pirofosforilase monofosfato de uridina, citosina permease e citosina desaminase, ou o aumento da produção de pirimidinas (Chandra *et al.*, 2009b).

A resistência à terbinafina por *Candida* e dermatófitos permanece de ocorrência rara, sendo este fármaco bastante eficaz contra uma ampla variedade de leveduras e fungos filamentosos *in vitro* (Jessup *et al.*, 2000; Darkes *et al.*, 2003). No entanto, outras espécies fúngicas destacam-se como resistentes à terbinafina, incluindo *A. fumigatus* (Leber *et al.*, 2003; Graminha *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). As principais causas de indução da resistência estão associadas à superexpressão de proteínas transportadoras (bombas de efluxo), principalmente as codificadas pelo gene *CDR* (Darkes *et al.*, 2003) e mutação no gene *ERG1* (Leber *et al.*, 2003).

Devido à recente inclusão das equinocandinas na terapêutica antifúngica, são limitados os dados sobre a resistência a esta classe de fármaco. Os casos de resistência intrínseca, já descritos em *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Fusarium* spp. e zigomicetos estão associados com quantidades insuficientes da enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase ou uma forma mutante da enzima que impede a ligação do fármaco (Chandra *et al.*, 2009a). A resistência adquirida envolve a mutação do gene *FKSI*, que codifica uma subunidade da  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase (Balashov *et al.*, 2006; Chandra *et al.*, 2009a).

#### 2.2.4. Associação de compostos antifúngicos

O uso da terapia antifúngica combinada tem sido relatada desde o final da década de 1970 (Codish *et al.*, 1979), com os melhores dados clínicos provenientes dos tratamentos de meningite criptocócica com associação de AmB e 5FC, qual demonstrava altas taxas de cura e melhora quando comparado à monoterapia com AmB (Bennett *et al.*, 1979; Vanderhorst *et al.*, 1997).

A interação de dois antimicrobianos em sítios diferentes da célula fúngica pode promover associações sinérgicas ou antagônicas (Tabela 2).

Tabela 2 - Interações *in vitro* e *in vivo* entre compostos antifúngicos.

Associação	Microrganismo	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
AmB + 5FC	<i>Candida</i>	S, AD, I	S, AD
	<i>Cryptococcus</i>	S, I, AN	S, I
	<i>Aspergillus</i>	S, AD, I, AN	S, AD, I
	<i>Rhizopus</i>	S	
	<i>Absidia</i>	AD	
AmB + Itraconazol	<i>Candida</i>	AN	I, AN
	<i>Aspergillus</i>	S, AN	AN
	<i>Scedosporium</i>	S, AD	
	<i>Cryptococcus</i>	I	S, I
AmB + Fluconazol	<i>Candida</i>	AD, I, AN	I, AN
	<i>Cryptococcus</i>	S, I	I, AN
	<i>Scedosporium</i>	S, AD	
	<i>Aspergillus</i>	I, AN	I
AmB + Terbinafina	<i>Aspergillus</i>	S, AD, I, AN	I
	<i>Rhizopus, Absidia, Candida</i>	S, AD	
	<i>Aspergillus</i>		AN
AmB + Cetoconazol	<i>Scedosporium</i>	S, AD	
AmB + Miconazol	<i>Aspergillus</i>	S, I, AN	AD, I, AN
AmB + Novos azólicos*	<i>Fusarium</i>	S, I, AN	
	<i>Pseudoallescheria, Scedosporium,</i>	AD, I	
	<i>Acremonium</i>	AD, I	
	<i>Candida</i>	S, AD, I	I
	<i>Aspergillus</i>	S, AD, I	S, AD, I
AmB + equinocandinas	<i>Fusarium</i>	S, AD, I	
	<i>Scedosporium, Cryptococcus</i>	S	
	<i>Aspergillus</i>		I
	<i>Aspergillus</i>		I
ABLc + Itraconazol	<i>Aspergillus</i>		AN
ABLc + Equinocandinas	<i>Aspergillus</i>		I
Fluconazol + equinocandina	<i>Candida</i>	I	I
Fluconazol + 5FC	<i>Candida</i>	S, I, AN	S, AD, I
	<i>Cryptococcus</i>	S, AD, I	S, I
Itraconazol + terbinafina	<i>Aspergillus</i>	S, AD	
	<i>Fusarium</i>	S, I	
	<i>Scedosporium</i>	S	
	<i>Aspergillus</i>	AN	
Itraconazol + 5FC	<i>Aspergillus</i>	S, AD, I	
	<i>Fusarium</i>	I	
Novos azólicos* + Equinocandinas	<i>Aspergillus</i>	S, AD, I	S, AD, I
	<i>Fusarium</i>	S, I	
	<i>Rhizopus, Absidia, Cunninghamella</i>	S	
	<i>Rhizomucor, Mucor, Syncephalastrum</i>	S	
	<i>Scedosporium</i>	S, AD, I	
	<i>Pseudoallescheria</i>	AD, I	
	<i>Acremonium</i>	AD, I	
	<i>Aspergillus, Fusarium</i>	S	
	<i>Rhizopus</i>	S, AD	
	<i>Absidia</i>	AD	
Terbinafina + 5FC	<i>Aspergillus</i>	I, AN	
Equinocandinas + 5FC	<i>Aspergillus</i>	AN	

AmB, anfotericina B; 5FC, flucitosina; ABLc, complexo lipídico de AmB; LAmB, AmB lipossomal; S, sinergismo; AD, adição; I, indiferente; AN, antagonismo; \*Voriconazol, posaconazol ou ravuconazol. Compilação de Baddley e Pappas, 2005; 2007; Ostrosky-Zeichner, 2008; Vazquez, 2008.

Os poros formados na membrana pela ação da AmB sobre o ergosterol permite o aumento da concentração intracelular de 5FC (Beggs, 1986) ou rifampicina (Beggs *et al.*, 1976), resultando em interação sinérgica entre as drogas. No entanto, a redução da concentração de ergosterol resultante da terapia com antifúngicos azólicos faz com que existam menos sítios de ligação ergosterol-AmB, resultando em antagonismo, quando estes dois fármacos estiverem associados (Sugar, 1995), situação que nem sempre é observada na prática clínica (Tabela 2).

Os fármacos que alteram a farmacocinética dos compostos antifúngicos também podem gerar associações sinérgicas ou antagonicas. Por exemplo, sinergismo tem sido observado entre fluconazol e inibidores de proteases, uma vez que estes diminuem o metabolismo hepático do fluconazol, resultando no aumento da concentração plasmática (Lewis e Kontoyiannis, 2001). Por outro lado, a associação de fluconazol com fármacos que são metabolizadas pelo sistema citocromo P450 resulta em uma associação antagonica pois ocorre indução do metabolismo do fluconazol e diminuição da concentração plasmática deste azólico (Lewis *et al.*, 1999).

Além das interações diretas com a célula fúngica, os compostos antifúngicos apresentam propriedades imunomoduladoras, que associadas às necessidades do hospedeiro, podem melhorar o prognóstico (Ben-Ami *et al.*, 2008). A antotéricina desoxicolato apresenta propriedades pró-inflamatórias, com consequente liberação de citocinas de células mononucleares e neutrófilos *in vitro* (Wilson *et al.*, 1991; Cleary *et al.*, 1992) e induz a resposta com células Th1 *in vivo* (Cenci *et al.*, 1997), enquanto que a anfotericina lipossomal produz um padrão mais anti-inflamatório de citocinas, consequente da indução do receptor Toll-like (Bellocchio *et al.*, 2005). A inibição de *Aspergillus fumigatus* é reforçada quando macrófagos e monócitos são expostos à equinocandinas (Chiller *et al.*, 2001), enquanto que a presença de fluconazol ou voriconazol está associada com uma melhora da fagocitose quando associado com terapias que estimulam o sistema imunológico (Vora *et al.*, 1998; Baltch *et al.*, 2001).

#### 2.2.5. Compostos orgânicos de selênio com ação antifúngica

A descrição das propriedades antimicrobianas dos compostos orgânicos de selênio remete à década de 1950 quando os análogos de selênio contendo sulfonamidas foram avaliados. Apesar de muitos dos compostos contendo selênio serem mais ativos do que seus análogos com sulfonamidas, seu uso no tratamento de infecções não se tornou evidente

provavelmente por apresentarem maior toxicidade do que seus equivalentes com enxofre (Mugesh *et al.*, 2001).

Estudos recentes sobre as propriedades antifúngicas do ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one), composto de baixa toxicidade que compartilha propriedades farmacológicas com o (PhSe)<sub>2</sub> (Nogueira *et al.*, 2004), mostram que este composto e seus análogos apresentam uma moderada atividade antifúngica contra espécies de *Candida* e *Aspergillus* (Bien *et al.*, 1999; Wojtowicz *et al.*, 2004; Billack *et al.*, 2009), *Cryptococcus* (Soteropoulos *et al.*, 2000) e *Saccharomyces* (Bien *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2007). Os mecanismos de ação propostos envolvem a interação do fármaco com grupos sulfidrilas das células (Wojtowicz *et al.*, 2004) e a capacidade de inibir a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática fúngica (Billack *et al.*, 2010).

### 2.3. Infecções Fúngicas

#### 2.3.1. Classificação geral dos fungos

Fungos são seres eucariotas com características distintas de plantas e animais tais como a) célula fúngica protegida por uma parede celular rígida, principalmente composta por quitina e glucana; b) heterotróficos, não possuindo clorofila e nutrição baseada na secreção de enzimas digestivas para o exterior da célula e posterior absorção de nutrientes liberados no meio ambiente; c) ausência de divisão de células para a formação de órgãos ou tecidos, apresentando-se morfológicamente como cadeias tubulares de células (hifas) ou células únicas independentes (blastoconídios); d) reprodução assexuada e sexuada com formação de propágulos fúngicos denominados conídios ou esporos (Brandt e Warnock, 2003).

A classificação dos fungos apresenta uma complexa evolução, com diversas propostas taxonômicas e chaves de classificação, como revisado por Lacaz *et al.*, 2002. Classicamente, o Reino Fungi pode ser dividido em 4 grupos, de acordo com a estrutura e o processo de formação dos propágulos reprodutivos: *Chytridiomycota* (não patogênicos para os humanos), *Zygomycota* (exemplo, fungos patogênicos das Ordens Entomoftorales e Mucorales), *Ascomycota* (exemplo, fungos patogênicos dos gêneros *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Aspergillus* e *Candida*) e *Basidiomycota* (exemplo, fungos patogênicos dos gêneros *Cryptococcus*, *Malassezia* e *Trichosporon*).

Atualmente, objetivando uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre estes organismos e os mecanismos envolvidos na patogênese das doenças fúngicas, diversas reclassificações são propostas através de técnicas de biologia molecular, incluindo estudos



comparativos das sequências de ácidos nucleicos entre as espécies (Montes *et al.*, 2003). Estas novas abordagens representam importantes avanços na rápida e correta identificação dos fungos, que, associadas aos testes clássicos de identificação, possibilitam uma melhor escolha do tratamento e melhor prognóstico.

### 2.3.2. Epidemiologia das infecções fúngicas

Numerosos fatores contribuem para o aumento das infecções fúngicas, especialmente os associados com a crescente população de pacientes imunossuprimidos ou imunocomprometidos, a maior sobrevivência de pacientes com condições clínicas crônicas e as novas estratégias terapêuticas, incluindo o uso de antibióticos de amplo espectro, quimioterapia citotóxica e transplante de órgãos (Richardson e Lass-Flörl, 2008).

As taxas de infecções fúngicas nosocomiais diferenciam-se entre hospitais e entre regiões devido a fatores locais, perfis e práticas médicas e fatores de riscos subjacentes. Nos Estados Unidos, as septicemias causadas por fungos aumentaram 207% entre 1979 e 2002 (Martin *et al.*, 2003) e representaram a sétima causa mais comum de doença infecciosa relacionada com mortalidade entre 1980 e 1997 (Mcneil *et al.*, 2001). Em estudo multicêntrico entre 49 instituições de saúde, dos 24.179 relatos de hemoculturas positivas, entre 1995 e 2002, as infecções fúngicas representaram 9,5% dos isolados microbianos, com *Candida* spp. representando a quarta posição entre os microrganismos recuperados, superada apenas por bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

No Brasil, as informações sobre as taxas de infecções fúngicas são escassas e dispersas (Colombo *et al.*, 1999; Antunes *et al.*, 2004). Recentemente, um pioneiro estudo brasileiro incluindo 11 centros médicos relatou a incidência, a distribuição das espécies e a frequência de resistência antifúngica para espécies de *Candida* isoladas de casos de candidemia (Colombo *et al.*, 2006). A avaliação dos 712 casos ocorridos entre 2003 e 2004, mostraram uma incidência de 2,49 casos por 1.000 admissões, índices de mortalidade de 54%, rara resistência ao fluconazol (1%) e com *Candida albicans* representando a espécie mais comumente isolada (40,9%), seguido por *Candida tropicalis* (20,9%) e *Candida parapsilosis* (20,5%).

Os principais patógenos fúngicos associados com infecções nosocomiais incluem as espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e os agentes de zigomicoses. No entanto, um significativo aumento no número de infecções fúngicas estão relacionados a espécies emergentes de leveduras (*Malassezia* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula rubra* e *Saccharomyces cerevisiae*), hialo-hifomicoses (*Fusarium* spp., *Acremonium* spp.,

*Scedosporium apiospermum* e *Paecilomyces lilacinus*) e feo-hifomicoses (*Alternaria* spp., *Scedosporium prolificans* e *Bipolaris spicifera*) (Lockhart *et al.*, 2009).

## 2.4. Pitiose

### 2.4.1. Epidemiologia

Os casos de pitiose humana e animal são causados pelo oomiceto *Pythium insidiosum* e geralmente são provenientes de regiões de clima tropical e subtropical. Apesar de ser mais diagnosticado na Austrália, Ásia e América Latina, alguns casos são procedentes de áreas temperadas do Japão, Coréia do Sul e Estados Unidos, alguns países europeus, Oceania e África (Lamour e Kamoun, 2009; Mendoza e Vilela, 2009). No Brasil, o primeiro relato ocorreu no Rio Grande do Sul em 1974 (Santos e Londero, 1974) e casos da doença já foram descritos no Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Pará, Paraíba, Paraná e Rio de Janeiro, sendo a região do Pantanal brasileiro considerada como local de maior incidência e prevalência de pitiose equina do mundo (Santurio e Ferreiro, 2008).

Geralmente *P. insidiosum* se desenvolve em áreas pantanosas, com ciclo biológico baseado na colonização de plantas aquáticas, as quais servem de substrato para o crescimento vegetativo miceliano e formação assexuada de zoósporos biflagelados móveis que se movimentam pela água, encontram outro hospedeiro, encistam e formam novo micélio, iniciando nova colonização (Miller, 1983). As hifas de *P. insidiosum* não apresentam capacidade suficiente para penetrar na pele saudável intacta, o que sugere que lesões macro ou microscópicas são necessárias para a infecção ocorrer em homens e animais (Ravishankar *et al.*, 2001).

Em vista deste ciclo biológico, os casos de pitiose estão associados ao contato humano ou animal com áreas onde ocorre acúmulo de água contendo zoósporos (banhados e lagos) e com temperatura ambiental entre 30 e 40°C. A maioria dos relatos de pitiose animal descritos são em equinos que habitam áreas pantanosas e, em humanos, uma maior frequência tem sido observada em pacientes talassêmicos tailandeses, onde é comum o trabalho em áreas alagadas de cultivo do arroz. Não há relatos de transmissão entre animais e entre animais e homens e *P. insidiosum* é a única espécie deste gênero capaz de infectar mamíferos e pássaros (Santurio e Ferreiro, 2008; Lamour e Kamoun, 2009).

#### 2.4.2. Manifestações clínicas

Nos animais a pitiose caracteriza-se pela presença de lesões ulcerativas e piogranulomatosas (cutâneas e subcutâneas) ou profundas (viscerais), sendo os equinos mais afetados (Poole e Brashier, 2003). Os cães representam a segunda espécie de incidência (Dykstra *et al.*, 1999), com alguns casos relatados em bovinos (Santurio *et al.*, 1998; Thomas e Lewis, 1998), felinos (Thomas e Lewis, 1998), ovinos (Tabosa *et al.*, 2004) e esporadicamente em animais mantidos em cativeiro em zoológicos (Grooters, 2003; Camus *et al.*, 2004) e pássaros (Pesavento *et al.*, 2008).

Nos equinos, as lesões ulcerativas, granulomatosas e mucossanguinolentas tem aparência tumoral e ocorre formação de grandes massas teciduais geralmente nas extremidades distais dos membros (Figura 4), porção ventral (abdômen) e face, regiões anatômicas de maior contato com águas contaminadas. Nos cães e gatos, o comprometimento gastrointestinal é mais comum (devido à ingestão de água com zoósporos) e manifesta-se como distúrbios digestivos (vômito, anorexia, diarréia, etc). Nos casos menos frequentes de pitiose, em ovinos e bovinos, lesões cutâneas granulomatosas são observadas na extremidades distais dos membros (Santurio e Ferreiro, 2008).

Em humanos (Figura 4), *P. insidiosum* pode causar infecções superficiais: ceratite com envolvimento da córnea (Virgile *et al.*, 1993; Murdoch e Parr, 1997; Badenoch *et al.*, 2001); infecções cutâneas e subcutâneas: pitiose orbital, envolvimento ósseo (Triscott *et al.*, 1993; Shenep *et al.*, 1998; Bosco *et al.*, 2005) e infecções sistêmicas: arterite nos membros inferiores e/ou disseminação (Thianprasit *et al.*, 1996; Thitithanyanont *et al.*, 1998; Krajaejun *et al.*, 2006). Apesar da pitiose acometer indivíduos aparentemente saudáveis (Triscott *et al.*, 1993; Thianprasit *et al.*, 1996), em pacientes tailandeses a doença tem uma maior frequência em indivíduos com talassemia e/ou desordens sanguíneas similares (Sathapatayavongs *et al.*, 1989; Thitithanyanont *et al.*, 1998; Wanachiwanawin *et al.*, 2004).

#### 2.4.3. Diagnóstico

Embora compartilhe semelhança estrutural com microrganismos fúngicos, *P. insidiosum* apresenta características peculiares em seu ciclo biológico que faz com que a maioria dos laboratórios não disponham de estrutura funcional necessária para sua identificação. O diagnóstico clássico da pitiose é realizado através dos aspectos clínicos e histopatológicos, além das características culturais, morfológicas e reprodutivas *in vitro*. O

diagnóstico diferencial inclui habronemose, neoplasia, tecido de granulação exuberante e granulomas fúngicos e bacterianos (Santurio e Ferreiro, 2008).

Na avaliação microscópica com emprego de KOH 10% (exame direto), realizada geralmente de raspados ou swabs de casos de ceratite, observa-se *P. insidiosum* desenvolvendo hifas hialinas e eventualmente septadas, morfologia que facilmente pode ser confundida com a maioria dos fungos filamentosos (Mendoza e Vilela, 2009). A cultura, geralmente a partir de biópsias ou *kunkers* (massas necróticas), pode ser realizada no ágar V8 ou ágar farinha de milho (CMA) acrescidos de antibióticos. O crescimento de hifas pode ser visto entre 12 a 24 horas após a incubação a 37°C, e estas apresentam-se submersas no meio e com coloração branca ou hialina (Grooters *et al.*, 2002). Uma vez que *P. insidiosum* não produz estruturas reprodutivas nos meios tradicionais de cultura, a indução da zoosporogênese (formação assexuada de zoósporos) pode ser obtida a partir do cultivo de *P. insidiosum* em folhas de grama estéreis que posteriormente são transferidas para uma solução de sais minerais (Mendoza e Prendas, 1988).

Desta forma, a indução da zoosporogênese representa uma etapa necessária para a identificação (Bentinck-Smith *et al.*, 1989), realização de testes de suscetibilidade *in vitro* (Pereira *et al.*, 2007; Argenta *et al.*, 2008; Cavalheiro *et al.*, 2009a) e para a reprodução experimental da doença em coelhos (Mendoza e Prendas, 1988; Chaiprasert *et al.*, 1990; Santurio *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2007). No entanto, a correta identificação desta espécie deve ser confirmada com de metodologias moleculares (Grooters e Gee, 2002; Schurko *et al.*, 2004; Vanittanakom *et al.*, 2004).

O diagnóstico precoce da pitiose pode ser feito com métodos imunohistoquímicos (Trost *et al.*, 2009) ou através de testes sorológicos para a detecção de anticorpos, tais como imunodifusão em gel de ágar (Mendoza *et al.*, 1996), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Mendoza *et al.*, 1997; Krajaejun *et al.*, 2002), *Western blot* (WB), aglutinação em látex (Mendoza e Vilela, 2009) e testes imunocromatográficos (Krajaejun *et al.*, 2009).

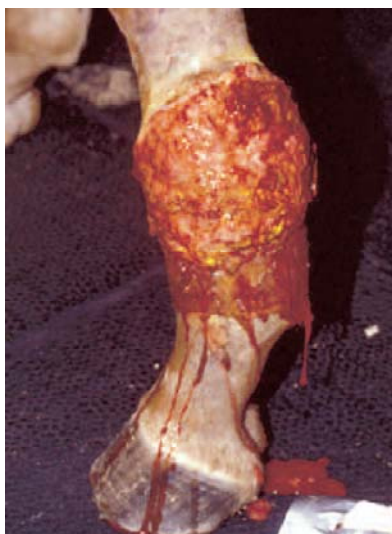
**A****B****C****D**

Figura 4 - A, pitiose cutânea na extremidade distal de equino (Poole e Brashier, 2003); B, pitiose cutânea e gastrointestinal em um labrador, com lesão delimitada, ulcerativa e área alopecica (Pereira *et al.*, 2010); C, pitiose orbital - cura clínica com enucleação cirúrgica do globo ocular (Lamour e Kamoun, 2009); D, pitiose em membro inferior com arterite ascendente necrótica em paciente talassêmico, trabalhador em estrebaria; tratamento com amputação do membro inferior acima do joelho (Laohapensang *et al.*, 2009).

#### 2.4.4. Tratamento

Considerando que os principais fármacos antifúngicos agem direta ou indiretamente sobre o ergosterol e que *P. insidiosum* não tem ergosterol em sua membrana citoplasmática, é compreensível que casos de pitiose não respondam satisfatoriamente ao tratamento com antifúngicos. No entanto, resultados contraditórios com o uso de antifúngicos no tratamento da pitiose têm sido relatados (Shenep *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2004; Krajaejun *et al.*, 2006).

*In vitro*, isolados de *P. insidiosum* apresentam suscetibilidade variável à caspofungina (Pereira *et al.*, 2007), voriconazol, itraconazol e terbinafina (Argenta *et al.*, 2008), entre outros. Avaliações da associação de fármacos antifúngicos, *in vitro*, mostram promissores resultados, com sinergismo encontrado na associação de AmB + terbinafina (Cavalheiro *et al.*, 2009b), terbinafina + antifúngicos azólicos e terbinafina + caspofungina (Cavalheiro *et al.*, 2009a).

Casos de sucesso e insucesso terapêutico já foram descritos com terapias combinadas de antifúngicos, tais como AmB + 5FC e itraconazol + terbinafina em casos de ceratite humana. A remoção cirúrgica da lesão, amputação do membro afetado ou enucleação do olho afetado representam o último recurso no tratamento da pitiose em humanos. No entanto taxas de recorrência de 40% têm sido observadas, o que ilustra a dificuldade do controle desta doença (Mendoza e Vilela, 2009). Em animais, a remoção cirúrgica apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais. Associações do tratamento cirúrgico com antifúngicos ou iodeto de potássio são descritas em casos de cura terapêutica. Terapias satisfatórias para cães não foram observadas e o tratamento de equinos com antifúngicos mostra-se economicamente inviável (Santurio e Ferreiro, 2008).

A imunoterapia desenvolvida a partir de extratos protéicos obtidos de culturas de *P. insidiosum* representa uma alternativa não invasiva no tratamento da pitiose em humanos e animais. Em humanos foram observadas taxas de cura de até 55%, enquanto que em equinos, respostas favoráveis já foram descritas em mais de 70% dos casos, com os melhores resultados observados quando a doença encontra-se nos estágios iniciais (Mendoza e Newton, 2005; Santurio e Ferreiro, 2008).

O mecanismo proposto para o sucesso terapêutico da imunoterapia está baseado na mudança da resposta celular. A resposta imunológica observada na pitiose envolve inflamação eosinofílica e expressão de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2), com liberação de interleucinas (IL-4 e IL-5), com mobilização de eosinófilos e mastócitos. Os antígenos do imunoterápico produzem a expressão de linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1), produção de IL 2 e interferon- $\gamma$ , com mobilização de linfócitos T e macrófagos que destroem as células de *P. insidiosum* (Mendoza e Newton, 2005).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do disseleneto de difenila e da terapia antifúngica combinada contra fungos patogênicos e *Pythium insidiosum*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana do disseleneto de difenila *in vitro*, através de testes de suscetibilidade padronizados, contra o oomiceto *Pythium insidiosum*.

- Determinar a eficácia do tratamento com o disseleneto de difenila na pitiose experimental em coelhos.

- Verificar a atividade antifúngica do disseleneto de difenila *in vitro*, através de testes de suscetibilidade padronizados, contra fungos patogênicos.

- Comparar a atividade antifúngica do disseleneto de difenila *in vitro* com a atividade antifúngica de seus análogos estruturais substituídos com grupos funcionais contendo cloro, fluor e metóxil contra fungos patogênicos.

- Determinar a eficácia do tratamento com a terapia antifúngica combinada na pitiose experimental em coelhos.

- Comparar a eficácia de diferentes protocolos para a indução *in vitro* da zoosporogênese de *P. insidiosum*.

- Avaliar metodologias de conservação de isolados de *P. insidiosum* por longos períodos de incubação.

#### **4. MANUSCRITOS**

Os resultados que compõem esta tese estão apresentando sob a forma de Manuscritos, os quais estão organizados nas seções Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. Os manuscritos estão formatados segundo as normas exigidas pelas Revistas Científicas aos quais serão (ou foram) submetidos.



#### 4.1. Atividade *in vitro* e *in vivo* do disseleneto de difenila contra *Pythium insidiosum*

Manuscrito 1

### **ATIVIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO DISSELENETO DE DIFENILA CONTRA *PYTHIUM INSIDIOSUM***

Érico Silva Loreto<sup>1</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>2</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>1</sup>,  
Gilson Zeni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**Título:** Atividade *in vitro* e *in vivo* do Disseleneto de Difenila contra *Pythium insidiosum*

**Autores:** Érico Silva Loreto<sup>1</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>2</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>1</sup>, Gilson Zeni<sup>1</sup>

### **Afiliações**

<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **Endereço para correspondência:**

Sydney Hartz Alves

Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil. Fone/Fax: +55 55 32208906. E-mail: hartzsa@smail.ufsm.br

### **Resumo**

Infecções causadas pelo oomiceto *P. insidiosum* ocorrem em animais e humanos, caracterizam-se por apresentar altos níveis de morbidade e mortalidade e grande insucesso terapêutico com o emprego de antifúngicos. O presente trabalho avaliou a suscetibilidade de 19 isolados de *P. insidiosum* frente ao disseleneto de difenila *in vitro* e correlacionou os resultados com a resposta terapêutica *in vivo* através da indução de pitiose experimental em coelhos. O teste de suscetibilidade com o (PhSe)<sub>2</sub> demonstrou ação fungicida *in vitro*, com CIM<sub>90</sub>, CIM<sub>100</sub> e CFM ≤ 1 µg/mL para 100%, 84,2%, 68,4% dos isolados de *P. insidiosum* testados, respectivamente. A avaliação do tratamento com disseleneto de difenila sugere uma ação fungistática *in vivo*, com menor progressão das lesões induzidas por *P. insidiosum* no grupo recebendo 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub>. Avaliações bioquímicas e hematológicas sugerem que o tratamento com 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub> não provoca efeitos colaterais, de acordo com os parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** disseleneto de difenila, *Pythium insidiosum*, suscetibilidade, pitiose experimental

## Introdução

A descrição das propriedades antimicrobianas dos compostos orgânicos de selênio (OS) remete à década de 1950 quando os análogos de selênio contendo sulfonamidas foram avaliados. Apesar de muitos dos OS serem mais ativos do que seus análogos com sulfonamidas, seu uso no tratamento de infecções não se tornou evidente provavelmente por apresentarem maior toxicidade do que seus equivalentes com enxofre (1).

O disseleneto de difenila ( $\text{PhSe}_2$ ) é um OS simples, estável e altamente lipofílico, amplamente utilizado como intermediário em sínteses orgânicas (2) que reage de forma muito eficiente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos. A reação é semelhante à que catalisada pela enzima glutathione peroxidase (3). Extensivos estudos têm sido focados sobre os efeitos toxicológicos e farmacológicos do ( $\text{PhSe}_2$ ) em diferentes modelos biológicos, como revisado por Rosa *et al.* (4), destacando-se as atividades antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antiúlcera e hepatoprotetora. No entanto, as propriedades antimicrobianas deste composto não foram descritas na literatura.

*Pythium insidiosum* é um oomiceto patogênico que causa uma doença granulomatosa no tecido subcutâneo em humanos e animais, principalmente cavalos, cachorros e gatos (5-6). As apresentações clínicas da pitiose em humanos incluem as formas cutânea e subcutânea, ocular, vascular e formas disseminadas da doença e geralmente não respondem ao tratamento convencional com antifúngicos, o que resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade (7-8). Em animais, a remoção cirúrgica apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais. A associação do tratamento cirúrgico com antifúngicos ou iodeto de potássio e a imunoterapia são descritas em casos de cura terapêutica (6, 9-10).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente ao ( $\text{PhSe}_2$ ) e a resposta do tratamento da pitiose experimental em coelhos com ( $\text{PhSe}_2$ ).

## Materiais e métodos

### *Microrganismos*

Dezessete isolados clínicos de *P. insidiosum* isolados de casos de pitiose em animais (16 equinos e 1 ovino) e os isolados ATCC 58.637 e CBS 101.555 foram utilizados. A identificação dos isolados foi confirmada pela técnica de PCR de acordo com Grooters e Gee (11) pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

### *Disseleneto de difenila*

O (PhSe)<sub>2</sub> (Figura 1) foi sintetizado de acordo com Paulmier (12). Análises dos espectros <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR demonstraram que o composto apresentava dados analíticos e espectroscópicos de acordo com os atribuídos à estrutura do (PhSe)<sub>2</sub>. A pureza química do (PhSe)<sub>2</sub> (99,9%) foi determinada por GC/HPLC pelo Laboratório de Síntese, Reatividade, Avaliação Toxicológica e Farmacológica de Organocalcogênios da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

### *Teste de Suscetibilidade in vitro*

A avaliação da suscetibilidade foi realizada utilizando-se o método de macrodiluição em caldo, de acordo com as normas do protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institutes* (CLSI) (13). O inóculo, diluído em caldo RPMI 1640, pH 7.0, consistia de 2 a 3 x 10<sup>3</sup> zoósporos/mL que foram obtidos de acordo com a técnica de indução de zoosporogênese descrita por Santurio *et al.* (9). A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C e constituía-se da observação visual da presença ou ausência de crescimento miceliano. Os critérios de leitura foram: CIM<sub>90</sub> e CIM<sub>100</sub> (inibição de 90% e 100% do crescimento miceliano, respectivamente). A concentração fungicida mínima (CFM) foi obtida adicionando-se 5 mL de caldo Sabouraud estéril aos tubos onde não houve crescimento e posterior incubação por 96 horas a 37°C. A média geométrica (MG) foi calculada para os valores de CIM e CFM. Os testes foram feitos em duplicatas.

### *Pitiose experimental e tratamentos com disseleneto de difenila*

Vinte coelhos da raça Nova Zelândia de 3 meses de idade, incluindo machos e fêmeas, foram divididos em 4 grupos de 5 animais. Os coelhos dos grupos 1 e 2 foram inoculados, através da via subcutânea, com 20.000 zoósporos/mL de *P. insidiosum*, de acordo com a metodologia proposta por Santurio *et al.* (9). O tratamento com (PhSe)<sub>2</sub>, por via oral (sonda gástrica), iniciou trinta dias após a inoculação, sendo que os animais do grupo 1 receberam 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub>, dissolvido em óleo de canola (1 mL/Kg). Os animais dos grupos 2 e 3 receberam apenas óleo de canola (1mL/Kg). Os animais do grupo 4 foram tratados com 10mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub>, dissolvido em óleo de canola (1mL/Kg). A área nodular (cm<sup>2</sup>) das lesões subcutâneas induzida pela pitiose experimental nos coelhos dos grupos 1 e 2 foram determinadas, em intervalos de 4 dias após o início do tratamento com (PhSe)<sub>2</sub>, utilizando-se

um paquímetro e medindo-se o tamanho transversal e longitudinal das lesões. Todos os animais foram tratados por 40 dias.

#### *Análises bioquímica e hematológica*

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento de anestesia utilizando-se tiopental (20 mg/Kg) e amostras de plasma e soro coletadas e separadas para a realização de testes bioquímicos e hematológicos. Os parâmetros bioquímicos foram avaliados utilizando-se *kits* comerciais (Labtest<sup>®</sup>) e analisador de eletrólitos (AVL 9140<sup>®</sup>, Roche). Os parâmetros hematológicos foram determinados por automação hematológica (Pentra 60<sup>®</sup>, Horiba ABX) e confecção de lâminas coradas para a observação microscópica das células.

#### *Análise estatística*

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Duncan, utilizando-se um nível de significância de 5%.

## **Resultados**

#### *Teste de Suscetibilidade in vitro*

O teste de suscetibilidade *in vitro* dos 19 isolados de *P. insidiosum* frente ao (PhSe)<sub>2</sub> está descrito na Tabela 1. Os resultados indicam que todos isolados apresentaram uma CIM<sub>90</sub>  $\leq$  1  $\mu$ g/mL, 84,2% dos isolados apresentaram CIM<sub>100</sub>  $\leq$  1  $\mu$ g/mL e 68,4% dos isolados apresentaram uma CFM  $\leq$  1  $\mu$ g/mL. A média geométrica (MG) foi de 0,41  $\mu$ g/mL, 0,86  $\mu$ g/mL e 1,15  $\mu$ g/mL para a CIM<sub>90</sub>, CIM<sub>100</sub> e CFM, respectivamente.

#### *Pitiose experimental e tratamentos com disseleneto de difenila*

A variação percentual do tamanho das lesões (área nodular) dos coelhos inoculados experimentalmente com zoósporos de *P. insidiosum* (grupos 1 e 2) está descrita na Figura 2. A área das lesões subcutâneas do grupo 2 (controle), tratados apenas com óleo de canola aumentaram progressivamente, com um aumento percentual de 76,6% das lesões após 40 dias de tratamento. A área nodular do grupo 1 ((PhSe)<sub>2</sub>, 10 mg/mL/Kg) exibiu uma redução em sua progressão durante os primeiros 14 dias de tratamento. No entanto, as lesões voltaram a

crescer a partir da 3ª semana de tratamento, com um aumento percentual de 36,3% das lesões após 40 dias de tratamento.

#### *Análises bioquímica e hematológica*

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos coelhos dos grupo 1, 2, 3 e 4 estão distribuídos nas Tabelas 2 e 3. Diferenças estatísticas foram observadas nos níveis de albumina, creatinina, fosfatase alcalina, proteína C reativa (PCR), proteína total, sódio, transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP). Os níveis de albumina dos grupos 1 e 2 (pitiose) foram estatisticamente menores que os grupos 3 e 4 (controle). O grupo 1 apresentou valores de albumina estatisticamente superiores ao grupo 2. Os níveis de proteínas totais foram superiores nos grupos 1 e 2 quando comparados com os grupos 3 e 4. Os níveis de creatinina, fosfatase alcalina, PCR, TGO e TGP foram estatisticamente iguais entre os grupos 1 e 2 e inferiores aos grupos 3 e 4. Os níveis de sódio entre os grupos 1 e 2 foram diferentes entre si e iguais aos grupos 3 e 4.

A análise estatística dos parâmetros hematológicos mostrou que os coelhos que desenvolveram pitiose (grupo 1 e 2) apresentavam níveis elevados de leucócitos, caracterizado por eosinofilia e linfocitopenia quando comparado com os grupos 3 e 4 (controle). Os animais do grupo 1 apresentaram níveis superiores de plaquetas quando comparado com os grupos 2, 3 e 4. Os valores de Hematócrito (Ht) e Hemoglobina (Hb) dos grupos 1 e 2 foram iguais entre si e diferentes dos grupos 3 e 4.

#### **Discussão**

O teste de suscetibilidade de *P. insidiosum* frente ao (PhSe)<sub>2</sub> mostrou que este OS apresenta atividade fungicida, *in vitro*. Avaliações recentes sobre a suscetibilidade de *P. insidiosum* frente aos antifúngicos mostram CIMs de 8 – 64 ug/mL (MG= 36,38 µg/mL) para caspofungina (14), 16 - >32 µg/mL para itraconazol e voriconazol, 0,5 – 8 µg/mL (MG= 4 µg/mL) para terbinafina (15), 4 – 32 µg/mL (MG= 13,6 µg/mL) para miconazol, 16 – 64 µg/mL (MG= 23,1 µg/mL) para cetoconazol, 32 – 64 ug/mL (MG=59 µg/mL) para fluconazol (16) e 8 – 32 µg/mL para anfotericina B (MG=25,06 µg/mL) (17). Comparando-se estes resultados com os obtidos neste trabalho, observa-se a necessidade de uma concentração menor de (PhSe)<sub>2</sub> para inibir o crescimento de *P. insidiosum*.

A observação da progressão da área nodular das lesões dos coelhos com pitiose experimental sugere que o tratamento com 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub> apresentou uma atividade fungistática, nas condições avaliadas. Pereira *et al.* (14) observaram que, sob mesmo

protocolo de infecção experimental, a caspofungina (1 mg/Kg/dia) apresentou um perfil fungistático *in vivo*, mesmo tendo demonstrado atividade fungicida *in vitro*. Novos protocolos de terapia com (PhSe)<sub>2</sub>, alterando-se a dose e o tempo de tratamento podem elucidar a compreensão da eficácia deste OS no tratamento da pitiose.

O mecanismo de ação *in vitro* do (PhSe)<sub>2</sub>, em comparação com o mecanismo de ação do ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one), composto de baixa toxicidade que compartilha propriedades farmacológicas com o (PhSe)<sub>2</sub> (3), pode envolver interações com grupos sulfidrilas das células fúngicas (18) e a capacidade de inibir a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática fúngica (19). Adicionalmente, considerando que espécies de *Pythium* não sintetizam esteróis e que podem incorporar esteróis do ambiente, estimulando seu crescimento e proteção contra antibióticos (20), a atividade fungistática *in vivo* do (PhSe)<sub>2</sub> pode envolver também a redução da síntese de colesterol que os compostos de selênio promovem (21-22).

Uma avaliação geral dos parâmetros bioquímicos mostrou que os coelhos com pitiose subcutânea não apresentaram um perfil característico para a doença quando comparados aos grupos controles 3 e 4 (controle). A observação dos níveis de TGO, TGP, uréia e creatinina permite sugerir que o tratamento com o (PhSe)<sub>2</sub> não apresenta efeitos tóxicos hepáticos e renais. A hiperproteinemia observada nos coelhos com pitiose provavelmente está associada com uma elevação no nível de globulinas resultante da formação de anticorpos em resposta à infecção enquanto que a hipoalbuminemia está associado com aumento da mortalidade (23). Os níveis de albumina do grupo 1, próximos aos controles (grupos 3 e 4) e diferentes do grupo 2 (controle sem tratamento) sugerem um melhor prognóstico na evolução da doença dos coelhos com pitiose e tratados com (PhSe)<sub>2</sub>.

A hiperproteinemia também poderia estar associada com um aumento de proteínas da fase aguda da inflamação. No entanto, a ausência de alterações nos valores da proteína C reativa, geralmente em níveis elevados em processos inflamatórios, não permite caracterizar um perfil inflamatório da doença. Em contraste com a hipercalcemia descrita na pitiose canina (24), não foram observadas alterações nos níveis de cálcio iônico na pitiose em coelhos, quando comparados com os grupos controle.

O perfil hematológico, com leucocitose, eosinofilia e linfopenia são marcadores clássicos da pitiose e está associado com uma resposta com linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2). O sucesso dos tratamentos utilizando-se a imunoterapia está associado com uma mudança da resposta de Th2 para Th1 (25). Desta forma, propostas de associação da imunoterapia com a quimioterapia com antifúngicos ou (PhSe)<sub>2</sub> merecem avaliações futuras.

Em conclusão, observou-se que  $(\text{PhSe})_2$  inibe o crescimento de *P. insidiosum in vitro*, com atividade fungicida. A terapia proposta *in vivo* com  $(\text{PhSe})_2$  em coelhos com pitiose experimental sugere que este composto apresenta uma atividade fungistática, no modelo avaliado. Os índices bioquímicos e hematológicos indicam uma ausência de efeitos colaterais detectáveis pelos parâmetros comumente utilizados no laboratório clínico.



Tabela 1 - Teste de suscetibilidade dos 19 isolados de *Pythium insidiosum* frente ao disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>

Critério de leitura	Número de isolados (%) com a CIM/CFM (µg/mL) indicada					CIM (µg/mL)	MG (µg/mL)
	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0		
CIM <sub>90</sub>	07 (36,8)	10 (52,6)	02 (10,6)	0	0	0,25 - 1,0	0,41
CIM <sub>100</sub>	0	07 (36,8)	09 (47,4)	03 (15,8)	0	0,5 - 2,0	0,86
CFM	0	03 (15,8)	10 (52,6)	05 (26,3)	01 (5,3)	0,5 - 4,0	1,15

CIM<sub>90</sub>, inibição de 90% do crescimento; CIM<sub>100</sub>, inibição de 100% do crescimento; CFM, concentração fungicida mínima; MG, média geográfica.

Tabela 2- Perfil bioquímicos dos coelhos com pitiose experimental e/ou tratados com disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e controles

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
ALT (UI/L)	20.20 ± 6.53 <sup>a</sup>	24.20 ± 11.64 <sup>a</sup>	59.0 ± 31.19 <sup>b</sup>	43.0 ± 10.19 <sup>ab</sup>
Albumina (g/dL)	4.13 ± 0.51 <sup>b</sup>	3.13 ± 0.40 <sup>c</sup>	4.58 ± 0.17 <sup>ab</sup>	4.82 ± 0.15 <sup>a</sup>
Amilase (U/L)	126.2 ± 60.13	131.2 ± 21.20	147.0 ± 19.14	98.2 ± 17.36
AST (UI/L)	20.0 ± 7.58 <sup>a</sup>	19.6 ± 6.54 <sup>a</sup>	43.8 ± 27,16 <sup>b</sup>	34.20 ± 16.70 <sup>b</sup>
Cálcio iônico (mmol/L)	1.79 ± 0.17	1.70 ± 0.03	1.70 ± 0.11	1.68 ± 0.06
Creatina quinase (U/L)	1128 ± 362	1117 ± 390	1788 ± 422	1389 ± 823
Creatinina (mg/dL)	0.72 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.95 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.08 <sup>a</sup>
DHL (UI/L)	331.0 ± 56.62	304.4 ± 96.23	397.0 ± 138.97	426.0 ± 200.15
Ferro (ug/dL)	185 ± 91	228 ± 75	173 ± 48	190 ± 34
Fosfatase alcalina (U/L)	71.4 ± 39.80 <sup>b</sup>	47.80 ± 12.41 <sup>b</sup>	137.6 ± 53.63 <sup>a</sup>	161.2 ± 19.56 <sup>a</sup>
Fósforo (mg/dL)	5.80 ± 1.07	5.47 ± 0.42	5.34 ± 0.71	5.47 ± 0.67
GGT (UI/L)	11.7 ± 3.97	10.8 ± 4.36	7.02 ± 1.47	10.26 ± 4.74
Potássio (mmol/L)	4.28 ± 0.88	4.82 ± 1.28	4.42 ± 0.59	4.50 ± 0.96
Proteína C Reativa (mg/L)	10.64 ± 0.53 <sup>ab</sup>	9.50 ± 2.50 <sup>a</sup>	11.32 ± 0.77 <sup>ab</sup>	12.12 ± 0.88 <sup>b</sup>
Proteína total (g/dL)	7.39 ± 0.58 <sup>b</sup>	6.21 ± 0.64 <sup>b</sup>	5.13 ± 0.24 <sup>a</sup>	5.58 ± 0.38 <sup>a</sup>
Sódio (mmol/L)	144.2 ± 2.77 <sup>a</sup>	140.6 ± 2.30 <sup>b</sup>	142.2 ± 0.83 <sup>ab</sup>	141.6 ± 2.30 <sup>ab</sup>
Uréia (mg/dL)	33.6 ± 5.45	31.8 ± 4.65	33.6 ± 6.30	29.8 ± 2.86

Tratamentos: Grupo 1: Pitiose experimental (Pe) + 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub>; Grupo 2: Pe + óleo de canola (1 mL/Kg); Grupo 3: óleo de canola (1 mL/Kg); Grupo 4: 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub>

ALT, Alanina aminotransferase; AST, Aspartato aminotransferase; DHL, Desidrogenase láctica; GGT, Gama glutamil transferase

Tabela 3 - Perfil hematológico dos coelhos com pitiose experimental e/ou tratados com disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e controles

	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	30,16 ± 6,52 <sup>a</sup>	26,48 ± 7,19 <sup>a</sup>	6,04 ± 1,96 <sup>b</sup>	8,56 ± 2,52 <sup>b</sup>
Contagem diferencial de leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)				
Neutrófilos	0,33 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,68 <sup>a</sup>	1,82 ± 1,56 <sup>b</sup>
Eosinófilos	18,77 ± 7,08 <sup>a</sup>	16,76 ± 6,66 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,84 <sup>b</sup>	1,75 ± 2,02 <sup>b</sup>
Basófilos	0,62 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,03 <sup>b</sup>
Linfócitos	6,95 ± 0,67 <sup>a</sup>	7,26 ± 2,35 <sup>a</sup>	4,04 ± 1,51 <sup>b</sup>	4,44 ± 1,69 <sup>b</sup>
Monócitos	1,36 ± 0,60 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,71 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,18 <sup>b</sup>	0,44 ± 0,20 <sup>b</sup>
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	784 ± 122 <sup>a</sup>	461 ± 231 <sup>b</sup>	355 ± 34 <sup>b</sup>	522 ± 132 <sup>b</sup>
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	5,17 ± 0,62	5,52 ± 1,35	6,37 ± 0,77	5,72 ± 0,60
Hematócrito (%)	33 ± 1,96 <sup>a</sup>	32 ± 5,81 <sup>a</sup>	40 ± 3,69 <sup>b</sup>	38 ± 1,96 <sup>b</sup>
Hemoglobina (g/dL)	10,02 ± 0,73 <sup>a</sup>	10,28 ± 1,80 <sup>a</sup>	12,60 ± 1,03 <sup>b</sup>	11,98 ± 0,58 <sup>b</sup>
Volume corpuscular médio (fl)	64 ± 7,40	60 ± 5,44	62 ± 2,40	68 ± 4,63
Hemoglobina corpuscula média (HCM) (pg)	19 ± 2,78	18 ± 1,64	19 ± 1,00	21 ± 1,37
Concentração da HCM (g/dl)	30 ± 1,43 <sup>a</sup>	31 ± 0,77 <sup>ab</sup>	31 ± 0,49 <sup>b</sup>	31 ± 0,29 <sup>ab</sup>
Distribuição do tamanho dos eritrócitos (%)	14 ± 1,03 <sup>a</sup>	13 ± 1,43 <sup>ab</sup>	12 ± 0,90 <sup>b</sup>	13 ± 0,37 <sup>ab</sup>

Tratamentos: Grupo 1: Pitiose experimental (Pe) + 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub>; Grupo 2: Pe + óleo de canola (1 mL/Kg); Grupo 3: óleo de canola (1 mL/Kg); Grupo 4: 10 mg/Kg/dia de (PhSe)<sub>2</sub>

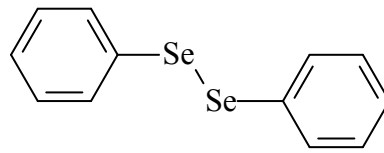


Figura 1 - Estrutura do disseleneto de difenila

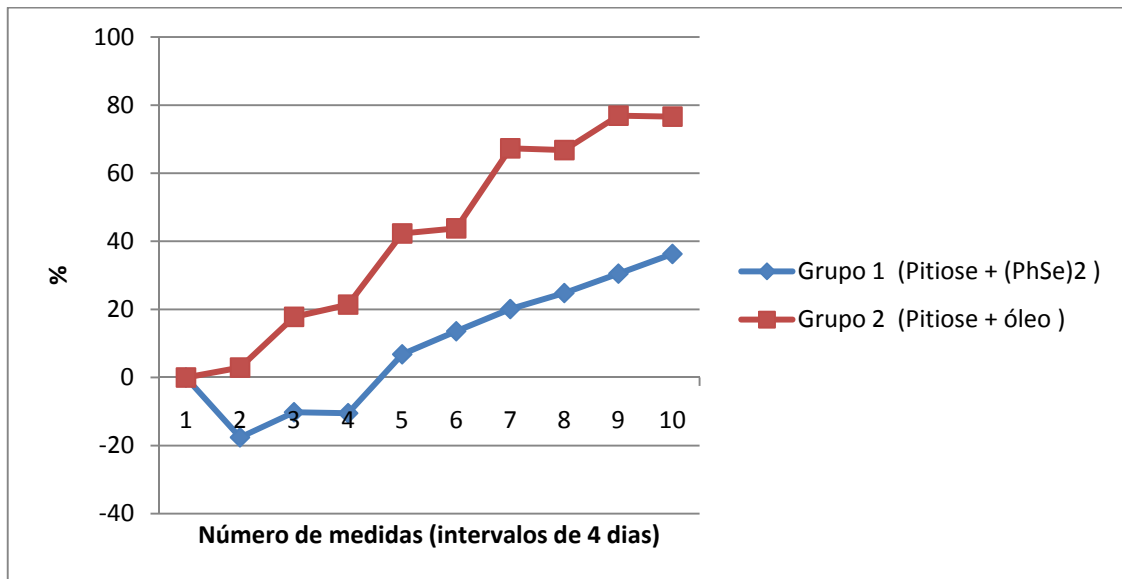


Figura 2 - Variação percentual do tamanho das lesões (área nodular) dos coelhos inoculados experimentalmente com zoósporos de *Pythium insidiosum* e tratados com disseleneto de difenila (10 mg/Kg/dia (grupo 1) e com óleo de canola (grupo 2, controle).

## Referências Bibliográficas

1. Mugesh G, du Mont WW, Sies H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev.* 2001 Jul;101(7):2125-79.
2. Moro AV, Nogueira CW, Barbosa NBV, Menezes PH, da Rocha JBT, Zeni G. Highly stereoselective one-pot procedure to prepare bis- and tris-chalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. *J Org Chem.* 2005 Jun 24;70(13):5257-68.
3. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev.* 2004 Dec;104(12):6255-85.
4. Rosa RM, Roesler R, Braga AL, Saffi J, Henriques JAP. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Oct;40(10):1287-304.
5. Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infections caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med.* 1996 Dec;6(4):151-64.
6. Santurio JM, Ferreiro L. Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica. 1 ed ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2008.
7. Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Kasitanon N, Thamprasert K, Vanittanakom N. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: Case report and literature review. *Semin Arthritis Rheu.* 2003 Dec;33(3):204-14.
8. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis.* 2006 Sep 1;43(5):569-76.
9. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Festugatto R, Lubeck I, Sallis ESV, et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosi developed and evaluated. *Vaccine.* 2003 Jun 2;21(19-20):2535-40.
10. Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine.* 2004 Sep 9;22(27-28):3613-21.
11. Grooters AM, Gee MK. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J Vet Intern Med.* 2002 Mar-Apr;16(2):147-52.
12. Paulmier C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C, editor. *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*. 1 ed ed. Oxford, England: Pergamon Press; 1986. p. 22-51.
13. Rex JH, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
14. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Potter L, Spanamberg A, et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemoth.* 2007 Nov;60(5):1168-71.
15. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DIB, Cavalheiro AS, Spanamberg A, et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Ch.* 2008 Feb;52(2):767-9.
16. Cavalheiro AS, Maboni G, de Azevedo MI, Argenta JS, Pereira DIB, Spader TB, et al. In Vitro Activity of Terbinafine Combined with Caspofungin and Azoles against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Ch.* 2009 May 1;53(5):2136-8.
17. Cavalheiro AS, Zanette RA, Spader TB, Lovato L, Azevedo MI, Botton S, et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol.* 2009 Jun 12;137(3-4):408-11.

18. Wojtowicz H, Kloc K, Maliszewska I, Mlochowski J, Pietka M, Piasecki E. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *Il Farmaco*. 2004 Nov;59(11):863-8.
19. Billack B, Pietka-Ottlik M, Santoro M, Nicholson S, Mlochowski J, Lau-Cam C. Evaluation of the antifungal and plasma membrane H(+)-ATPase inhibitory action of ebselen and two ebselen analogs in *S. cerevisiae* cultures. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2010 Mar 9.
20. Rawn CD, Schwarz M. Protection of *Pythium* Species Against Antibacterial Antibiotics by Cholesterol. *Phytopathology*. 1987;77(2):319-23.
21. Gupta N, Porter TD. Inhibition of human squalene monooxygenase by selenium compounds. *J Biochem Mol Toxicol*. 2002;16(1):18-23.
22. de Bem AF, Portella RD, Colpo E, Duarte MMMF, Frediane A, Taube PS, et al. Diphenyl Diselenide Decreases Serum Levels of Total Cholesterol and Tissue Oxidative Stress in Cholesterol-fed Rabbits. *Basic Clin Pharmacol*. 2009 Jul;105(1):17-23.
23. Devillota ED, Mosquera JM, Rubio JJ, Galdos P, Balda VD, Delaserna JL, et al. Association of a Low Serum-Albumin with Infection and Increased Mortality in Critically Ill Patients. *Intens Care Med*. 1980;7(1):19-22.
24. LeBlanc CJ, Echandi RL, Moore RR, Souza C, Grooters AM. Hypercalcemia associated with gastric pythiosis in a dog. *Vet Clin Path*. 2008 Mar;37(1):115-20.
25. Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine*. 2003 Jun 20;21(21-22):2797-804.

**4.2. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica e relação estrutura-atividade do disseleneto de difenila e sintéticos análogos**

Manuscrito 2

***IN VITRO* ANTIFUNGAL EVALUATION AND STRUCTURE-ACTIVITY  
RELATIONSHIP OF DIPHENYL DISELENIDE AND SYNTHETIC ANALOGS**

Érico Silva Loreto<sup>a</sup>, Débora Alves Nunes Mario<sup>b</sup>, Janio Morais Santurio<sup>b</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>b</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>a</sup>, Gilzon Zeni<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Manuscrito submetido à Revista *Mycoses* (ISSN 0933-7407)

**Title:** *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogs

**Author(s) and affiliation(s):** Érico Silva Loreto<sup>a</sup>, Débora Alves Nunes Mario<sup>b</sup>, Janio Moraes Santurio<sup>b</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>b</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>a</sup>, Gilzon Zeni<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

**Short title:** Antifungal evaluation of diphenyl diselenide

**Keywords:** diphenyl diselenide, antifungal activity, selenium.

**Address for correspondence:**

Sydney Hartz Alves

Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Phone/Fax: +55 55 32208906. E-mail: hartzsa@smail.ufsm.br

## Summary

We report on *in vitro* antifungal activity and the structure-activity relationship of diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>) and its synthetic analogs, (*p*-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub>, (*m*-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub> and (*p*-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub>, against 116 strains of pathogenic fungi. (PhSe)<sub>2</sub> showed the most inhibitory activity against *Candida albicans* (MIC of 4-32 µg/mL), *C. dubliniensis* (2-8 µg/mL), *Aspergillus* spp. (0.5-64 µg/mL) and *Fusarium* spp. (2-16 µg/mL). Its minimum fungicidal concentration (MFC) varied among *Candida albicans* (8-32 µg/mL), *C. dubliniensis* (2-32 µg/mL), *Aspergillus* spp. (16->64 µg/mL) and *Fusarium* spp. (4-64 µg/mL). Antifungal activity was decreased by the introduction of functional groups to the (PhSe)<sub>2</sub> molecule: (PhSe)<sub>2</sub> > (*p*-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub> > (*m*-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub> > (*p*-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub>.



## Introduction

Fungi can be pathogenic microorganisms for plants, animals and humans and may show acquired drug resistance during treatment. The past two decades have seen an increase in the incidence of life-threatening fungal infections, largely due to extensive use of broad-spectrum antibacterial treatment and increasing numbers of patients with immunosuppression from Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) or treatment regimes. A growing number of patients are under immunosuppressive therapy for major organ transplantation or antineoplastic therapy for cancer, both of which cause breaks in skin and mucosal tissue [1].

Compared to the repertoire of antibiotics used to manage bacterial diseases, far fewer drugs are currently available to treat fungal infections. The most widely used antifungal drugs (e.g., amphotericin B) are quite toxic and have serious side effects [1,2]. Although newer antifungal agents are less toxic, the cost of treatment limits their use.

We attempted to assess the antifungal properties of diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>, an organoselenium (OS) compound with pharmacological and toxicological effects reported *in vitro* and in animal models [3,4]. The antifungal activity and structure-activity relationships of the synthetic analogs *p*-chloro-diphenyl diselenide, *m*-trifluoromethyl-diphenyl diselenide and *p*-methoxyl-diphenyl diselenide were also determined.

## Materials and methods

### Chemicals

Diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>] and its disubstituted diaryl diselenides, *p*-chloro-diphenyl diselenide (**1a**), *m*-trifluoromethyl-diphenyl diselenide (**1b**) and *p*-methoxyl-diphenyl diselenide (**1c**) (Fig. 1) were synthesized according to published methods [5]. Analysis of the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. Proton nuclear magnetic resonance spectra (<sup>1</sup>H

NMR) were obtained at 200 MHz on a Bruker DPX-200 NMR spectrometer or at 400 MHz on a Bruker DPX-400 NMR spectrometer. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra ( $^{13}\text{C}$  NMR) were obtained either at 50 MHz on a Bruker DPX-200 NMR spectrometer or at 100 MHz on a Bruker DPX-400 NMR spectrometer. Spectra were recorded in  $\text{CDCl}_3$  solutions. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### ***Fungal species***

The activity of  $(\text{PhSe})_2$  and its analogs **1a**, **1b** and **1c** was tested against 116 fungal strains. Twelve strains were the standard microorganisms *Candida albicans* ATCC 44773, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. glabrata* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. lusitaniae* ATCC 66035, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28952, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16916, *Fusarium solani* ATCC 36031, *F. sporotrichioides* CBS 412.86 and *A. parasiticus* NRRL 2999.

Molecular analysis was performed to confirm the identity of the 28 *Fusarium* species used. A DNA fragment covering an internal transcribed spacer (ITS) was amplified with primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). The amplified fragments were analyzed on a 0.8% agarose gel [6], sequenced, and compared to DNA sequences of *Fusarium* from GenBank accession nos. **GQ149770**, **GQ149773**, **GQ149771**, **GQ149772**, **GQ149774** and **GQ149775**. Identification of 24 *C. dubliniensis* strains was previously confirmed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) using primers CDU (5'-GCGATCCCCA-3') [7] and B-14 (5'-GATCAAGTCC-3') [8]. The other fungal isolates were obtained from collections of the Laboratório de Pesquisas Micológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil (Tables 1 and 2).

### ***Diaryl diselenide stock solutions***

Stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Serial twofold intermediate dilutions were prepared as outlined in the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocols M27-A3 and M38A2 [9, 10]. Final dilutions were made in RPMI 1640 medium (Sigma) buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) buffer (Sigma). The final concentration of solvent did not exceed 1% in any wells. Aliquots (100  $\mu$ L) of each diaryl diselenide at a twofold final concentration were dispensed into the wells of plastic microdilution trays. The final concentrations of each diaryl diselenide were 0.125 to 64  $\mu$ g/mL.

#### ***Assay for antifungal activity***

*In vitro* antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts and molds were determined in a broth microtiter assay according to CLSI protocols M27-A3 and M38-A2, respectively, in RPMI 1640 medium buffered with MOPS. The inoculum was prepared to a final concentration of  $5.0 \times 10^2$  to  $2.5 \times 10^3$  cells per mL for yeasts and  $0.4 \times 10^4$  to  $5 \times 10^4$  CFU/mL for filamentous fungi. The suspensions were adjusted by a spectrophotometer ( $\lambda = 530$  nm) according to CLSI protocols for each species. Aliquots of 100  $\mu$ L were dispensed into the wells of microdilution plates containing the drug and incubated at 35°C; drug-free and yeast or mold-free controls were included. Plates containing *Rhizopus* spp. were examined after 24 hours (h). Yeasts and most opportunistic filamentous fungi including *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. and *Sporothrix* spp. were examined after 48h, and *Scedosporium* spp. was examined after 72h. Following incubation, the minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest test concentration without detectable growth. Minimum fungicidal concentrations (MFCs) were determined from a subculture of 10  $\mu$ L from each well without visual detectable growth into 1 mL of sterile Sabouraud broth and incubated at 37°C for 7 days. The MFC was defined as the lowest test concentration without growth of the organism.

## Results

*In vitro* activity of (PhSe)<sub>2</sub> was assessed against 44 strains of yeast and 7 strains of mold (Table 1). *C. albicans* growth was inhibited by (PhSe)<sub>2</sub>, with MICs of 4-32 µg/mL, fungicidal action (MFCs) of 4-64 µg/mL, and a geometric mean (GM) MIC and MFC of 8.35 and 11.81 µg/mL, respectively. The MIC and MFC of (PhSe)<sub>2</sub> for *C. dubliniensis* isolates were similarly low, at 2-16 µg/mL and 2-32 µg/mL, respectively, with a GM-MIC of 5.18 µg/mL and a GM-MFC of 10.37 µg/mL.

The MICs of (PhSe)<sub>2</sub> to *Candida haemulonii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa*, *C. tropicalis*, *Rhodotorulla spp.*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Trichosporon ovale* ranged from 4-64 µg/mL. Fungicidal effects were not observed until the highest tested concentrations (64 µg/mL). Reduced effectiveness of (PhSe)<sub>2</sub> against *Candida glabrata*, *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis* was observed with MIC and MFC values greater than 64 µg/mL (Table 1). A better understanding of the antifungal activity of (PhSe)<sub>2</sub> to these and other yeasts requires further studies with more species and more number of isolates strains.

Among filamentous fungi, the highest susceptibility was found in *Fusarium solani* ATCC 36031, for which MIC and MFC values were 2 µg/mL and 8 µg/mL, respectively. The MICs and MFCs for *Fonsecaea pedrosoi*, *Mucor indicus*, *Scedosporium spp.* and filamentous phase of *Sporothrix schenckii* were similar, at 32 and 64 µg/mL, respectively. *Rhizopus spp.* was not inhibited at 64 µg/mL (Table 1).

For a better understanding of our initial screening, the antifungal activity of (PhSe)<sub>2</sub> was retested with disubstituted diaryl diselenide compounds **1a**, **1b** and **1c** against a new group of 15 *C. albicans*, 9 *C. dubliniensis*, 13 *Aspergillus* and 28 *Fusarium* strains (Table 2). (PhSe)<sub>2</sub> was more effective than its analogs **1a**, **1b** and **1c** against *C. albicans*, with MICs ranging from 4-32 µg/mL and a GM-MIC of 11.05 µg/mL. MFC values of (PhSe)<sub>2</sub> were 8-32 µg/mL with a GM-MFC of 16 µg/mL. Analog **1a** and **1b** were weakly active against *C.*

*albicans* (MICs > 64 µg/mL). The activity of compound **1c** was higher than that of disubstituted **1a** and **1b**, with MIC values of 4-32 µg/mL (GM-MIC of 13.92 µg/mL) and MFCs from 8 to > 64 µg/mL.

Similar to the results for *C. albicans*, the introduction of functional groups containing chlorine (**1a**) and fluorine (**1b**) resulted in the loss of antifungal activity against *C. dubliniensis* (MICs higher than 64 µg/mL). Compound **1c** retained antifungal activity, with an MIC of 8 µg/mL and MFC values of 16-64 µg/mL (GM-MFC of 29.62 µg/mL). In comparison, (PhSe)<sub>2</sub> MICs were 2-8 µg/mL (GM-MIC of 4.32 µg/mL) and MFC values were 2-32 µg/mL (GM-MFC of 8.64 µg/mL).

As observed for *Candida*, the introduction of Cl (**1a**) in the (PhSe)<sub>2</sub> molecule resulted in loss of inhibitory activity to *Fusarium* and *Aspergillus*. Compound **1b** had poorer inhibitory activity than the (PhSe)<sub>2</sub> and compounds **1c**, inhibiting the growth of only some species of *Fusarium*. In general, (PhSe)<sub>2</sub> was the most active compound against *Fusarium spp.*, with a GM-MIC of 5.25 µg/mL and a GM-MFC of 14.13 µg/mL. In view of the excellent activity of (PhSe)<sub>2</sub> against *Fusarium*, and due to varying susceptibility among *Fusarium spp.*, a molecular analysis was performed to confirm the identity of *Fusarium* species.

(PhSe)<sub>2</sub> was the most effective compound against *Aspergillus*, with MIC values of 0.5-64 µg/mL (GM-MIC of 15.16 µg/mL) and MFC values of 16 to > 64 µg/mL. Compounds **1a**, **1b** and **1c** showed weak activity. *Aspergillus* species were not inhibited at concentrations < 64 µg/mL by compounds **1a**, **1b** and **1c**, except for *A. clavatus* (MIC of 32 µg/mL to compound **1c**) and *A. carbonarius* (MICs of 0.5 µg/mL to compound **1c**).

## Discussion

Diphenyl diselenide is a simple, stable and highly lipophilic OS widely used as an intermediate in organic synthesis [11] that reacts very efficiently with hydroperoxides and

organic peroxides. The reaction is similar to that catalyzed by glutathione peroxidase [3]. Extensive studies have focused on toxicological and pharmacological effects of (PhSe)<sub>2</sub> in different biological models, as reviewed by Nogueira *et al.* [3] and Rosa *et al.* [4], making this compound a good *Candidate* for therapeutic use. Of particular importance, antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory, anti-secretory, anti-ulcer and hepatoprotective properties have been attributed to (PhSe)<sub>2</sub> [4].

Since many current antifungal drugs have undesirable side effects and are ineffective against a great number of fungi, there is an urgent need for the next generation of antifungal agents. In contrast to the glutathione peroxidase-like activity of (PhSe)<sub>2</sub>, related diaryl diselenides and analogs, little attention has been given to their activity and structure-activity relationships against pathogenic viruses, bacteria and fungi [12].

In general, (PhSe)<sub>2</sub> showed the best antifungal activity among the four compounds tested. The anti-*Fusarium* activity is important because fusariosis is an opportunistic fungal disease with high mortality rates, due to the primary resistance of some *Fusarium* isolates to current antifungals. *In vivo* studies of (PhSe)<sub>2</sub> activity against *Fusarium* are currently underway. The antifungal activity of (PhSe)<sub>2</sub> against *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* were important too; the activity of (PhSe)<sub>2</sub> against *Candida* fluconazole-resistant strains deserves more *in vitro* and *in vivo* characterization studies.

This is the first report of *in vitro* antifungal activity of (PhSe)<sub>2</sub> and its synthetic analogs against agents of human mycoses. The significance of the discovery of these compounds as antifungal agents lie not only in the identification of an apparently novel antifungal activity of this class of OS but also in the potential of (PhSe)<sub>2</sub> to play a complementary role in the chemotherapy of fungal infections. Since it can reduce the main antioxidant non-enzymatic cellular defense of yeast, sensitizing the cell to the damaging effects of reactive oxygen

species [13], (PhSe)<sub>2</sub> appears to be a good *Candidate* for synergistic experimental therapeutic proposals with classical antifungal agents.

Another hypothesis for the biological mechanism of (PhSe)<sub>2</sub> antifungal activity involves its interaction with sulfhydryl groups of biomolecules present in fungal cells, similar to the mechanism proposed for benzenoselenazol-3(2H)-ones [14]. The decrease in antifungal activity observed with compounds **1a**, **1b** and **1c** may be due to differences in interactions with fungal cells caused by the electronic and steric effects of these compounds.

In conclusion, we demonstrate that (PhSe)<sub>2</sub> exhibited growth-inhibitory and fungistatic activities against pathogenic yeasts and filamentous fungi. Structural modifications of (PhSe)<sub>2</sub> led to a substantial reduction of antifungal activity. Its analogs may have lower cell toxicity, which increases their prospects in other pharmacological tests. Since (PhSe)<sub>2</sub> was tested in its native form, experimental *in vitro* and *in vivo* models for the combined treatment of fungal infections with (PhSe)<sub>2</sub> and conventional antifungals will lead to a better understanding of its pharmacological activity.

## References

- 1 Sigh N. Trends in the Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections: Predisposing Factors and the Impact of Antimicrobial Use Practices. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 1692-96.
- 2 Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki, M, Izumikawa K *et al.* Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in comparison with amphotericin B, liposomal amphotericin B, and micafungin against murine pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1868-70.
- 3 Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; **104**: 6255-86.

- 4 Rosa RM, Roesler R, Braga AL, Saffi J, Henriques JA. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Braz J Med Biol Res* 2007; **40**: 1287-304.
- 5 Paulmier C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C, Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. Oxford: Pergamon Press, 1986.
- 6 O'Donnell K, Sarver BA, Brandt M, Chang DC, Noble-Wang J, Park BJ *et al.* Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 2235-48.
- 7 Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov. phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995; **141**: 1507-21.
- 8 Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkeil V, Warthoe P *et al.* Identification of differentially expressed mRNA tests by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nuc Acids Res* 1993; **21**: 4272-80.
- 9 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved standard. Document M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2007.
- 10 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. Approved standard. Document M38-A2. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- 11 Moro AV, Nogueira CW, Barbosa NBV, Menezes PH, Rocha JBT, Zeni G. Highly stereoselective one-pot procedure to prepare bis- and trischalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. *J Org Chem* 2005; **70**: 5257-68.



12 Wójtowicz H, Chojnacka M, Młochowski J, Palus J, Syper L, Hudecowa D *et al.* Functionalized alkyl and aryl diselenides and antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *Il Farmaco* 2003; **58**: 1235-42.

13 Rosa RM, Oliveira RB, Saffi J, Braga AL, Roesler R, Dal-Pizzol F *et al.* Prooxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sci* 2005; **77**: 2398-411.

14 Muges G, du Mont WW, Sies H. The chemistry of biologically important organoselenium compounds. *Chem Rev* 2001; **101**: 2125–79.

Table 1. Initial screening of diphenyl diselenide as an antifungal agent *in vitro*.

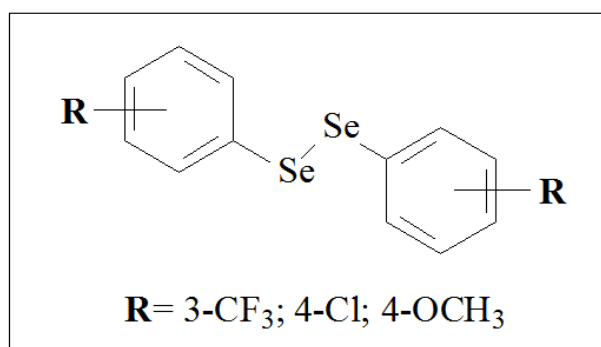
Organism	n	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	MFC ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Candida albicans</i>	15	4-32	4-64
<i>Candida albicans</i> ATCC 44773	-	16	64
<i>Candida dubliniensis</i>	15	2-16	2-32
<i>Candida dubliniensis</i> CBS 7987	-	8	32
<i>Candida glabrata</i> ATCC 10231	-	> 64	> 64
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	-	> 64	> 64
<i>Candida guilliermondii</i>	1	> 64	> 64
<i>Candida haemuloni</i>	1	8	> 64
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	-	32	> 64
<i>Candida lusitaniae</i> ATCC 66035	-	4	> 64
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	-	> 64	> 64
<i>Candida pelliculosa</i>	1	4	> 64
<i>Candida tropicalis</i>	1	32	> 64
<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	-	32	64
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	1	32	64
<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031	-	2	8
<i>Mucor indicus</i>	1	32	64
<i>Rhizopus</i> spp.	1	> 64	> 64
<i>Rhodotorula</i> spp.	1	64	> 64
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 28952	-	16	> 64
<i>Scedosporium</i> spp.	1	32	64
<i>Sporothrix schenckii</i>	1	32	64
<i>Trichosporon ovoide</i>	1	64	> 64

n, number of tested strains; MIC, minimum inhibitory concentration; MFC minimum fungicidal concentration.

Table 2. *In vitro* susceptibilities of yeast and filamentous fungi to diphenyl diselenide and its synthetic analogs.

Organism	n	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			MFC ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		(PhSe) <sub>2</sub>	<b>1a</b>	<b>1b</b>	<b>1c</b>	(PhSe) <sub>2</sub>	<b>1a</b>	<b>1b</b>	<b>1c</b>
<i>Candida albicans</i>	15	4 - 32	>64	>64	4 - 32	8 - 32	>64	>64	8 - >64
<i>Candida dubliniensis</i>	9	2 - 8	>64	>64	8	2 - 32	>64	>64	8
<i>Aspergillus clavatus</i>	1	8	>64	>64	32	32	>64	>64	>64
<i>Aspergillus carbonarius</i>	1	0.5	>64	>64	0.5	32	>64	>64	>64
<i>Aspergillus flavus</i>	4	16 - 64	>64	>64	>64	32 - >64	>64	>64	>64
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	4 - 32	>64	>64	8 - >64	16 - >64	>64	>64	>64
<i>Aspergillus niger</i>	2	8 - 32	>64	>64	>64	16 - >64	>64	>64	>64
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	16	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	2	2 - 16	>64	16 - 32	2 - 64	32 - 64	>64	>64	64 - >64
<i>Fusarium decemcellulare</i>	1	4	>64	16	8	16	>64	64	64
<i>Fusarium equiseti</i>	1	4	>64	64	8	8	>64	>64	64
<i>Fusarium graminearum</i>	1	2	>64	16	4	8	>64	64	32
<i>Fusarium moliniforme</i>	2	4 - 8	>64	16 - 64	8	8 - 64	>64	>64	64 - >64
<i>Fusarium napiforme</i>	1	4	>64	64	8	16	>64	64	64
<i>Fusarium oxysporum</i>	4	4 - 16	>64	8 - 32	4 - 16	4 - 32	>64	16 - >64	16 - 64
<i>Fusarium proliferatum</i>	2	1 - 8	>64	4 - 16	4 - 16	4 - 16	>64	4 - 32	4 - 32
<i>Fusarium scirpi</i>	2	4 - 8	>64	8 - 16	64	32 - 64	>64	>64	64
<i>Fusarium solani</i>	11	2 - 8	>64	16 - >64	8 - >64	8 - 64	>64	64 - >64	16 - >64
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	1	4	>64	16	8	64	>64	64	64

MIC, minimum inhibitory concentration; MFC minimum fungicidal concentration; n, number of tested strains  
**1a**, (*p*-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub>; **1b**, (*m*-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub>; **1c**, (*p*-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub>



**1a-** R = *p*-Cl

**2a-** R = *m*-CF<sub>3</sub>

**3a-** R = *p*-OCH<sub>3</sub>

Figure 1. Chemical structures of disubstituted diaryl diselenides.

### 4.3. Terapia antifúngica associada e parâmetros laboratoriais na pitiose

Manuscrito 3

#### ASSOCIATED ANTIFUNGAL THERAPY AND LABORATORIAL APPROACH IN PYTHIOSIS

Érico Silva Loreto<sup>1</sup>, Daniele Carvalho de Oliveira<sup>2</sup>, Ione Terezinha Denardin<sup>3</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>2</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>1</sup>, Gilson Zeni<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>3</sup> Colégio Politécnico, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**Title:** Associated Antifungal Therapy and Laboratorial Approach in Pythiosis.

**Author names:** Érico Silva Loreto<sup>1</sup>, Daniele Carvalho de Oliveira<sup>2</sup>, Ione Terezinha Denardin<sup>3</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>2</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>1</sup>, Gilson Zeni<sup>1</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup> Colégio Politécnico, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria

**Corresponding author:**

Sydney Hartz Alves

Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Phone/Fax: +55 55 32208906. E-mail: hartzsa@smail.ufsm.br

**Abstract**

The present study evaluated the *in vivo* efficacy of a combinatorial antifungal therapy on experimental pythiosis in rabbits and also determined the biochemical, hematological and histopathological parameters of this mycosis. Rabbits inoculated with viable *Pythium insidiosum* zoospores were divided into six groups of five animals each as follows: group I (control) did not receive an inoculum or treatment; group II (disease control) did not receive treatment; group III was treated with terbinafine + fluconazole + fluvastatin; group IV was treated with terbinafine + amphotericin B; group V was treated with terbinafine + ketoconazole; and group VI was treated with amphotericin B + rifampicin. Biochemical and hematological parameters were determined at the end of the experiments in the automated equipment. Grocott's stain was performed for a histopathological analysis. The subcutaneous lesions in the rabbits increased during treatment in all of the groups. The animals in group III were the only ones that showed a decrease in the average size of their lesions. Among the biochemical parameters studied, the increased levels of unsaturated iron binding capacity (UIBC) were observed in all rabbits with pythiosis. Hematological parameters showed leukocytosis and eosinophilia. Histological microscopy suggested fewer hyphae in the rabbits of group III. The reduction of leukocytosis and eosinophilia associated with lymphocytosis represents a positive prognosis for the therapy. High levels of UIBC are believed to be a marker for pythiosis. The association of terbinafine + fluconazole + fluvastatin demonstrated *in vivo* a promising potential for a combinatory therapy against pythiosis.

**Keywords:** *Pythium insidiosum*, experimental, rabbit, treatment

## Introduction

Pythiosis is a chronic pyogranulomatous disease caused by the oomycetous *Pythium insidiosum*, a fungus-like aquatic organism that inhabits swampy areas. It is present in the form of mycelium or biflagellate zoospores, which are the stage that attach to and penetrate the host's tissue, leading to the pathology. The disease has been reported in tropical and subtropical areas and can affect horses, dogs, bovines, felines, ovines and humans (Santurio et al., 2008).

The pythiosis progresses rapidly, and if not treated in the early stages, the infected hosts often die within weeks. Although there are some reports of patients who had subcutaneous pythiosis and were cured (Triscott et al., 1993; Shenep et al., 1998), the antifungal chemotherapy has been not effective (Santurio et al., 2008).

Recently, evaluation of monotherapy in experimental pythiosis with caspofungin (CPF) showed limited fungistatic activity (Pereira et al., 2007). However, the *in vitro* activity of combined antifungal agents as terbinafine (TER) + azoles antifungals, amphotericin B (AMB) or CPF showed synergistic interactions ranging from 11.8 to 41.2% of the tested strains (Argenta et al., 2008; Cavalheiro et al., 2009a; Cavalheiro et al., 2009b). Nevertheless, an *in vivo* experimental treatment using these combinations of antifungal agents has not taken place.

In the present study, rabbits were experimentally infected with *P. insidiosum* zoospores in order to evaluate the effectiveness of a combinatory treatment for pythiosis with (1) TER + fluconazole (FLZ) + fluvastatin (FLUV), (2) TER + AMB, (3) TER + ketoconazole (KTZ) and (4) AMB + rifampicin (RIF). Biochemical, hematological and histopathological parameters were also evaluated.

## Material and Methods

### *Chemicals*

Terbinafine (Medley<sup>®</sup>), amphotericin B (Bristol Myers Squibb<sup>®</sup>), fluconazole (Hipolabor<sup>®</sup>), ketoconazole (Janssen<sup>®</sup>), rifampicin (Aventis<sup>®</sup>) and fluvastatin (Novartis<sup>®</sup>) were obtained commercially. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### *Organism, zoosporogenesis and inoculum*

A *P. insidiosum* strain (Pi-210) that was recently isolated from a case of equine pythiosis in Brazil was employed. The identification of the strain was confirmed by a PCR based assay according to Grooters and Gee (2002). The inoculum consisted of Pi-210 zoospores obtained according to a previously described zoosporogenesis technique (Santurio et al., 2003).

### *Rabbits and treatments*

Three-month-old New Zealand rabbits, including males and females, received 1 mL of induction medium containing approximately 20,000 viable Pi-210 zoospores applied subcutaneously in the right costal region as described by Santurio et al. (2003). They were divided into groups of five animals as follows: group I (control) did not receive an inoculum or treatment; group II (disease control) did not receive treatment; group III was treated with TER + FLZ + FLUV; group IV was treated with TER + AMB; group V was treated with TER + KTZ; and group VI was treated with AMB + RIF.

The treatments began 30 days after zoospore inoculations and lasted for 70 days. Inoculated rabbits were checked every seven days by measuring the subcutaneous nodular area (cm<sup>2</sup>) using a sliding caliper. TER, FLZ and KTZ were dissolved in polyethylene glycol



300 (PEG300) and administrated orally (100 mg/Kg/day). RIF and FLUV were dissolved in PEG300 and administrated orally at 20 and 1 mg/Kg/day. AMB was dissolved in sterile distilled water and injected intraperitoneally (1 mg/Kg/day). The animals were treated according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

#### *Biochemical and hematological analysis*

The biochemical profile was determined in the end of the experiment using the automated analyzer LabMax 240<sup>®</sup> (Labtest Diagnostica S.A.) with commercial kits. Hematological data was obtained using the automated differential ABX Pentra 60C analyzer<sup>®</sup> (Horiba ABX).

#### *Histopathology*

The rabbits that were subjected to the antifungal treatment were necropsied at the end of the treatment. Representative fragments of the subcutaneous lesions were fixed in 10% buffered formalin, routinely processed for histopathologic evaluation and stained with Grocott's stain. To estimate the difference in the amount of hyphae in the lesions, a count of hyphae in the Grocott silver stain evaluating up to 5 microscopic fields chosen at random was performed.

#### *Statistical analysis*

The results are presented as mean  $\pm$  S.D. The statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test. Values of  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant.

## Results and discussion

One month after inoculation, the analysis of the subcutaneous nodular area showed that the nodules were firm and well-circumscribed ranging from 3.61 to 31.74 cm<sup>2</sup>. When the disease was not treated (group II) or did not respond to therapy, the lesions increased progressively.

The animals in group III (TER + FLZ + FLUV) showed a smaller amount of hyphae per field and mineralization in necrosis areas was also shown. Although it was observed in some animals from other treatments, this amendment was not a constant observation. There was no difference in the histopathological profile among the different groups. The animals treated with the combination TER + FLZ + FLUV (group III) were the only ones that showed a decrease in the average size of their lesions. One rabbit showed a gradual regression of the lesion after the third week of treatment and complete remission of the lesion after 10 weeks. The remaining animals showed lesions whose growth was significantly less than that of the control group (Group II) (Figure 1).

The rabbits treated with TER + AMB (group IV), TER + KET (group V) and AMB + RIF (group VI) showed lesions which increased progressively (Figure 1).

The addition of FLUV to the TER + FLZ association was used due to the additive and synergistic effects demonstrated in the association of ITZ + FLUV and FLZ + FLUV against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. Thus, the combination of fluconazole with fluvastatin made the fungistatic azole compound fungicidal (Chin et al., 1997). In spite of the antagonism observed *in vitro* between TER and FLUV against *P. insidiosum* (Cavalheiro et al., 2009b), the association of TER + FLZ + FLUV demonstrated *in vivo* promising potential as a combinatory therapy against pythiosis.

Although the *in vitro* activity of RIF against some *Pythium* strains has been reported (Cavalheiro et al., 2009b), the combinatory therapy with AMB was not effective.

Furthermore, the combination of TER with AMB or KET, which showed synergistic interactions *in vitro* with 41.18% and 29.4% of the studied strains respectively (Cavalheiro 2009a, 2009b), did not show therapeutic potential *in vivo*.

Statistical analysis of biochemical parameters (Table 1) showed a small change in the markers of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, urea and creatinine, suggesting that the antifungal treatments did not show toxic effects on liver and kidney systems under the conditions tested. The increased levels of total protein associated with unchanged or reduced albumin levels suggest an increase of globulins and/or protein in the acute phase of inflammation.

Interestingly, a rise in the Unsaturated Iron Binding Capacity (UIBC) was observed in all rabbits with pythiosis. The unsaturated transferrin is associated with reduced free iron bioavailability, limiting or inhibiting the growth of microorganisms because iron is an essential growth factor for many pathogenic fungi. Thus, the increase of UIBC in rabbits with pythiosis suggests a protective response by the host against an organism that depends on iron. The confirmation of this hypothesis and the possible inclusion of iron chelators in combinations with antifungal therapy are areas of study that require future exploration.

The obtained hematological parameters confirmed previous findings including persistent leukocytosis and eosinophilia (Table 1). The one rabbit that had the clinical cure (group III) showed hematological parameters similar to rabbits without pythiosis with a white blood cell count of  $9.9 \times 10^9/L$ , neutrophils 1%, lymphocytes 63%, monocyte 6%, eosinophils 29% and basophils 1%.

## **Conclusion**

In conclusion, the reduction of leukocytosis and eosinophilia associated with lymphocytosis represents a good prognosis for therapy. High levels of UIBC suggest the

involvement of the iron metabolism. The combinatory therapy with TER + FLZ + FLUV was the only treatment that showed a clinical cure in one rabbit.

### **Conflict of interest**

None.

### **References**

- Argenta, J.S., Santurio, J.M., Alves, S.H., Pereira, D.I., Cavalheiro, A.S., Spanamberg, 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, 767-69.
- 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.
- Grooters, A.M., Gee, M.K., 2002. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 147–152.
- Pereira, D.I.B.P., Santurio, J.M., Alves, S.H., Argenta, J.S., Pötter, L., Spanamberg, 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.
- 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.
- Santurio, J.M., Ferreiro, L., 2008. *Pitiose: Uma abordagem micológica e terapêutica*. Editora da UFRGS, Porto Alegre, pp. 33-48, 59-63.

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.

Triscott, J.A., Weedon, D., Cabana, E., 1993. Human subcutaneous pythiosis. J. Cutan. Pathol. 20, 267–271.

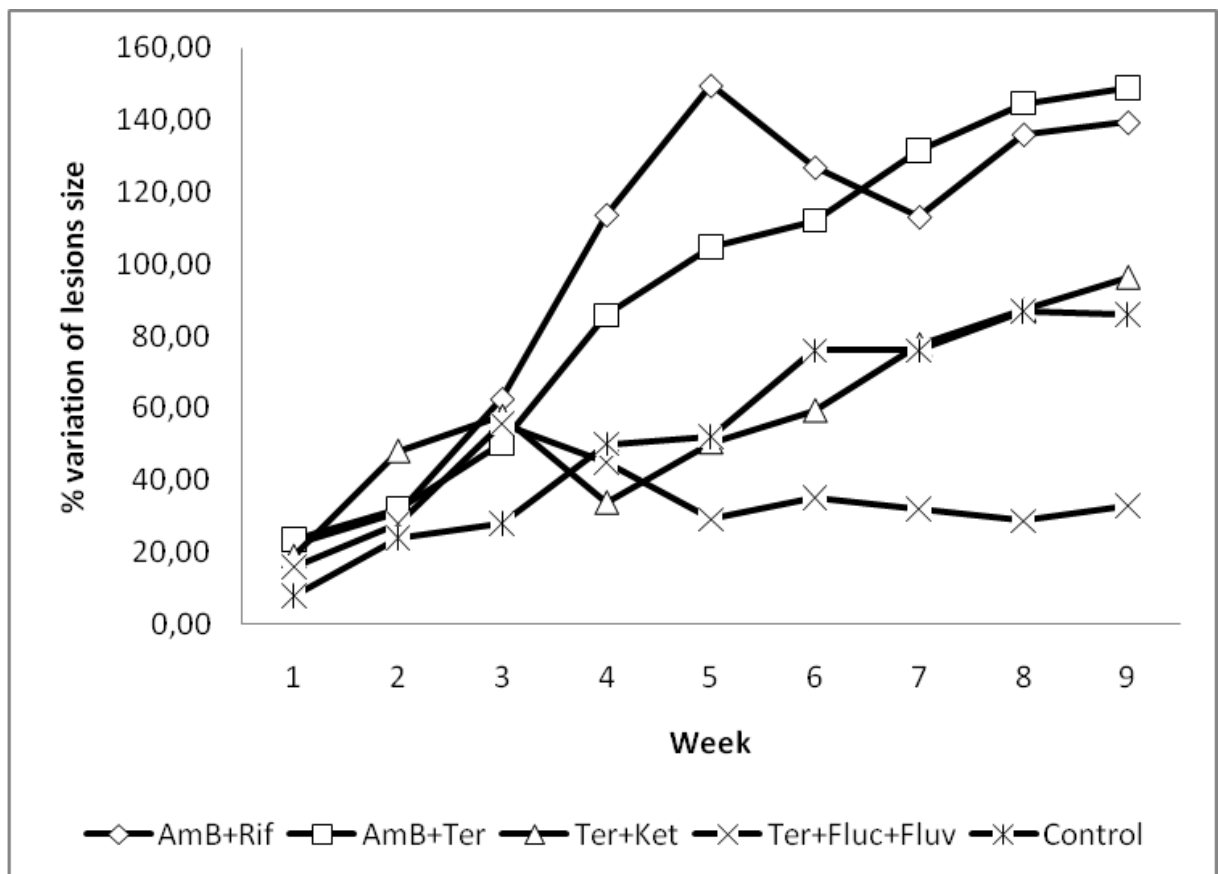


Figure 1 - Percentage variation of lesions size in rabbits inoculated experimentally with *Pythium insidiosum* zoospores and receiving combination antifungal therapy.

Table 1 – Serum levels of the biochemical markers and hematological parameters of rabbits with subcutaneous pythiosis.

	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
<b>Biochemical markers</b>						
Alanine aminotransferase (ALT) (UI/L)	47 ± 9.13	29 ± 6.0	49.2 ± 16.9	45.3 ± 16.2	47.0 ± 14.9	38.6 ± 5.1
Albumin (g/dL)	5.18 ± 0.23 <sup>a</sup>	4.14 ± 0.18 <sup>b</sup>	4.61 ± 0.50 <sup>ab</sup>	4.38 ± 0.98 <sup>b</sup>	4.08 ± 0.43 <sup>b</sup>	3.30 ± 0.37 <sup>c</sup>
Amylase (U/L)	148 ± 19 <sup>ab</sup>	129 ± 21 <sup>a</sup>	186 ± 57 <sup>ab</sup>	203 ± 46 <sup>b</sup>	164.75 ± 32 <sup>ab</sup>	178 ± 27 <sup>ab</sup>
Aspartate aminotransferase (AST) (UI/L)	67 ± 23.3 <sup>ab</sup>	45 ± 18.3 <sup>ab</sup>	42.0 ± 17.7 <sup>a</sup>	39.6 ± 18.1 <sup>ab</sup>	26.75 ± 12.6 <sup>ab</sup>	75.3 ± 62.2 <sup>b</sup>
Creatinine (mg/dL)	1.48 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.30 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.09 <sup>b</sup>
Iron (ug/dL)	291 ± 30 <sup>a</sup>	230 ± 29 <sup>ab</sup>	279 ± 34 <sup>ab</sup>	207 ± 52 <sup>b</sup>	245 ± 81 <sup>ab</sup>	220 ± 15 <sup>ab</sup>
Unsaturated iron binding capacity (UIBC) (ug/dL)	145 ± 21 <sup>a</sup>	375 ± 179 <sup>b</sup>	281 ± 75 <sup>ab</sup>	278 ± 115 <sup>ab</sup>	360 ± 151 <sup>b</sup>	179 ± 81 <sup>ab</sup>
Proteins (g/dL)	5.84 ± 0.90 <sup>a</sup>	7.58 ± 0.79 <sup>b</sup>	6.43 ± 1.30 <sup>ab</sup>	7.87 ± 0.80 <sup>b</sup>	6.74 ± 0.62 <sup>ab</sup>	6.85 ± 1.28 <sup>ab</sup>
Urea (mg/dL)	31.8 ± 3.3 <sup>a</sup>	38.2 ± 2.1 <sup>a</sup>	60.5 ± 14.0 <sup>b</sup>	68.6 ± 18.7 <sup>b</sup>	58.7 ± 17.5 <sup>b</sup>	57.6 ± 7.09 <sup>b</sup>
<b>Hematological parameter</b>						
White blood cells (WBC) count ( x10 <sup>9</sup> /L)	7.65 ± 1.44 <sup>a</sup>	20.59 ± 4.50 <sup>b</sup>	27.5 ± 17.53 <sup>b</sup>	26.76 ± 4.23 <sup>b</sup>	23.8 ± 5.37 <sup>b</sup>	34.76 ± 19.9 <sup>b</sup>
WBC differential count (x10 <sup>9</sup> /L)						
<i>Neutrophils</i>	0.30 ± 0.17	0.36 ± 0.10	0.52 ± 0.38	0.34 ± 0.10	0.30 ± 0.10	0.54 ± 0.53
<i>Eosinophils</i>	1.60 ± 0.44 <sup>a</sup>	12.04 ± 2.92 <sup>b</sup>	17.81 ± 17.01 <sup>b</sup>	17.41 ± 3.84 <sup>b</sup>	12.34 ± 0.22 <sup>b</sup>	27.26 ± 17.38 <sup>b</sup>
<i>Basophils</i>	0.07 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.48 ± 0.42 <sup>ab</sup>	0.45 ± 0.20 <sup>ab</sup>	0.30 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.81 ± 0.80 <sup>b</sup>
<i>Lymphocytes</i>	5.58 ± 1.44	6.78 ± 1.40	7.19 ± 1.32	5.19 ± 1.78	6.74 ± 3.14	4.67 ± 0.44
<i>Monocyte</i>	0.39 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.40 <sup>ab</sup>	1.12 ± 0.63 <sup>ab</sup>	1.28 ± 0.52 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.31 <sup>ab</sup>	1.47 ± 0.74 <sup>b</sup>
Platelet count ( x10 <sup>9</sup> /L)	122 ± 64 <sup>a</sup>	418 ± 154 <sup>b</sup>	291 ± 88 <sup>ab</sup>	418 ± 253 <sup>b</sup>	313 ± 228 <sup>ab</sup>	390 ± 163 <sup>b</sup>
Red blood cells count ( x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	6.39 ± 0.57 <sup>ab</sup>	6.46 ± 0.30 <sup>ab</sup>	5.33 ± 0.76 <sup>a</sup>	6.59 ± 0.67 <sup>b</sup>	6.07 ± 0.86 <sup>ab</sup>	6.08 ± 1.02 <sup>ab</sup>
<i>Hematocrit (Ht)</i>	39.2 ± 3.21	39.26 ± 1.85	34.1 ± 4.97	38.9 ± 1.43	36.37 ± 3.13	34.6 ± 3.59
<i>Hemoglobin concentration (Hb) (g/dL)</i>	13.12 ± 1.20 <sup>a</sup>	12.82 ± 0.58 <sup>ab</sup>	11.05 ± 1.55 <sup>b</sup>	12.30 ± 0.20 <sup>abc</sup>	11.52 ± 0.74 <sup>abc</sup>	10.83 ± 0.90 <sup>c</sup>
<i>Mean corpuscular volume (MVC)</i>	61 ± 0.89 <sup>ab</sup>	60 ± 1.94 <sup>ab</sup>	64.0 ± 2.82 <sup>a</sup>	59.3 ± 3.78 <sup>ab</sup>	60.25 ± 4.57 <sup>a</sup>	57.3 ± 3.78 <sup>b</sup>
<i>Mean corpuscular hemoglobin (MCH)</i>	20.56 ± 0.28 <sup>b</sup>	19.90 ± 0.71 <sup>bc</sup>	20.7 ± 0.98 <sup>b</sup>	18.8 ± 1.47 <sup>ac</sup>	19.17 ± 1.54 <sup>bc</sup>	18.0 ± 1.56 <sup>a</sup>
<i>MCH concentration (MCHC)</i>	33.4 ± 0.38 <sup>a</sup>	33.0 ± 0.29 <sup>ab</sup>	32.3 ± 0.40 <sup>bc</sup>	31.6 ± 0.64 <sup>c</sup>	31.8 ± 0.77 <sup>c</sup>	31.3 ± 1.0 <sup>c</sup>
<i>Red cell distribution width (RDW)</i>	12.7 ± 1.67	14.1 ± 1.07	11.7 ± 0.50	14.2 ± 3.4	13.52 ± 1.76	14.7 ± 1.77

Note: All values are expressed as mean ± SD. Different superscripted letters appear when there is a statistical difference for one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ ). Group I, control without disease; group II, disease control; group III, terbinafine + fluconazole + fluvastatin; group IV, terbinafine + amphotericin; group V, terbinafine + ketoconazole; group VI, amphotericin + rifampicin.

#### 4.4. Zoosporogênese e conservação de *Pythium insidiosum*

Manuscrito 4

### ZOOSPOROGENESIS AND CONSERVATION OF *PYTHIUM INSIDIOSUM*

**Authors:** Érico Silva Loreto<sup>1</sup>, Claudia Lautert<sup>2</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>2</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>1</sup>, Gilson Zeni<sup>1</sup>

#### **Affiliations**

<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**Title:** Zoosporogenesis and conservation of *Pythium insidiosum*

**Authors:** Érico Silva Loreto<sup>1</sup>, Claudia Lautert<sup>2</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>2</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Cristina Wayne Nogueira<sup>1</sup>, Gilson Zeni<sup>1</sup>

**Affiliations**

<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

**Address for correspondence:**

Sydney Hartz Alves

Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Phone/Fax: +55 55 32208906. E-mail: hartzsa@smail.ufsm.br



## Summary

*Pythium insidiosum* is an oomycete that causes severe ulcerative and granulomatous lesions in mammals, including humans. The production of mobile zoospores by this species is associated with disease transmission. The production of zoospores *in vitro* is necessary for the identification of this species, experimental reproduction of disease in rabbits and to perform susceptibility tests. This study aimed to evaluate the production of zoospores *in vitro* by subculture of *P. insidiosum* in different nutritionally rich culture media (chocolate agar (CHO) or egg yolk agar (EYA)) and poor (corn meal agar (CMA) and yeast extract agar (YEA)). Additionally, the conservation of this oomycete for long periods was evaluated. The zoosporogenesis protocol that provided the highest score of zoospores / mL was obtained by initial incubation of *P. insidiosum* on CHO, followed by two subcultures of 24 hours in YEA before adding the pieces of grass in the medium. The conservation of the isolates of *P. insidiosum* in hemolysis tubes containing water and pieces of grass provided the recovery of all samples kept for 7 months at 25°C.

## Introduction

Pythiosis is a life-threatening subcutaneous ulcerative, proliferative and pyogranulomatous disease caused by the oomycetous *Pythium insidiosum*, a fungus-like aquatic organism [1]. Naturally, *P. insidiosum* inhabits swampy areas where it is present in the form of mycelium or biflagellate zoospores. The zoospore is an infective stage that swims, attaches to and penetrates host tissue, possibly leading to pathology [1-2]. The disease has been reported from tropical, subtropical, and temperate areas of the world [3-5].

In animals, the infection develops with superficial (cutaneous/subcutaneous) or deep (visceral) chronic lesions, being horses the most affected animal, dogs are the second [6], with few cases reported in bovines [7], felines [8], ovines [9], and sporadically in captive zoo animals [10-11] and birds [12]. In humans, three clinical forms have been observed: cutaneous or subcutaneous, ophthalmic and systemic pythiosis [13], with very high levels of morbidity and mortality [4].

Zoospores can be obtained *in vitro* using the technique of zoosporogenesis in a liquid medium by transferring pieces of plants infected by *P. insidiosum* to an induction medium containing salts [14-15]. Since *P. insidiosum* grows only as mycelium on traditional culture media (such as Sabouraud and Corn Meal agar), the induction of zoosporogenesis represents a necessary step towards the identification [16], *in vitro* susceptibility tests [17-19] and experimental reproduction of the disease in rabbits [14-15, 17, 20].

Although isolates of *P. insidiosum* recently recovered from pythiosis cases can produce zoospores *in vitro* more efficiently, stock collection isolates submitted to subsequent cycles of subculturing over long periods can be attenuated or lost the ability to produce zoospores and even the growth viability. The objectives of the present study were to evaluate the influence of different media on zoosporogenesis and growth of *P. insidiosum* isolates and its storage viability for long periods of time.

## Material and Methods

### *Culture media*

Blood Agar (BLA) and Chocolate Agar (CHO) plates (MBIOLOG Diagnósticos), Corn Meal Agar (CMA) (Himedia), Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar (CLED) (Himedia), Yeast Extract (Himedia) and Agar powder (Himedia) were purchased commercially. Freshly tomato and beetroot juice and yolk egg were used. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. Commercially culture media were prepared in accordance with manufacture instructions. Other media and broth were prepared with the following composition per liter: a) *V8 agar* (V8A): 15g agar, 2g CaCO<sub>3</sub>, 200mL tomato juice; b) *beetroot agar* (BJA): 15g agar, 2g CaCO<sub>3</sub>, 200mL beetroot juice; c) *egg yolk agar* (EYA): 15g agar, 2g CaCO<sub>3</sub>, 100 mL yolk egg; d) *yeast extract agar* (YEA): 15g agar, 2g yeast extract; e) *corn meal agar yeast extract* (CMAYE): commercial CMA + 2g yeast extract; f) *minimal medium yeast extract broth* (MMYE): 1.8g glucose, 0.4g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.12g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.42g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.27g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g yeast extract; g) *induction medium* (IM): solution 1: 174.18g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 136.10g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 132.08g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; solution 2: 101.68g MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O, 73.52g CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O. IM final composition was 0.5 ml of solution 1 plus 0.1 ml of solution 2 in 1000 ml of sterile distilled water. In the V8A, BJA, EYA, YEA and CMAYE preparation, the water was replaced with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, to stabilize the pH of the media. All media were sterilized at 121°C for 15 min. For agar media, Petri's dishes were filled with 25 ml of the medium. Egg yolk and IM salts were added to sterilized and cooled at 40°C base medium.

### *Pythium insidiosum isolates*

*P. insidiosum* ATCC 58.637 and other sixteen clinical isolates of *P. insidiosum* were used in experiments. All isolates were recovered from cases of equine pythiosis. The

identification of the strains was previously confirmed by a PCR assay according to Grooters and Gee [21].

### ***Radial growth***

After 48h of incubation at 37 °C on CMA, a piece of agar containing 1 cm<sup>2</sup> of mycelium growth of the isolate Py 210 (from recently equine pythiosis case) was transferred for BJA, BLA, CHO, CLED, CMA, EYA and V8A. The radial mycelial growth was measured after 48h of incubation at 37 °C. The test was performed in triplicate.

### ***Zoosporogenesis***

Zoospores *in vitro* were obtained during incubation of infected grass (*Paspallum notatum*) with *P. insidiosum* in IM. Initially, to assess the influence of culture media used in the growth of *P. insidiosum* before and during the addition of grass on the culture medium the strain Py 210 was cultured on a chocolate agar plate at 37°C for 72h. After this initial growth, pieces of 1 cm<sup>2</sup> of the agar layer on the plate covered with *P. insidiosum* mycelia were transferred to 5 different cycles of subcultures (protocols) on different agars before adding pieces of grass and transfer the grasses parasitized by IM, as described in Table 1.

The pieces of grass with approximately 0.5 cm long were previously autoclaved for 40 min and distributed around 2 cm<sup>2</sup> of *P.insidiosum* cultures. The induction medium containing pieces of grass infected by *P. insidiosum* was incubated at 37°C for 24 when the pieces of grass were observed by microscopy and zoospores were counted using a Neubauer chamber.

### ***Preservation methods***

Hemolysis tubes covered with cotton (7.0 cm x 1.0 cm) containing 10 to 20 pieces of grass with 0.5 to 1 cm<sup>2</sup> were filled with 4 mL of distilled water or MMYE and autoclaved for

40 min/121°C. Pieces of 0.5 cm<sup>2</sup> of YEA containing mycelium growth of *P. insidiosum* ATCC 58.637 and sixteen clinical of *P. insidiosum* isolates previously incubated at 37°C for 48 hours were added into the tubes. Sterile mineral oil in sufficient volume to cover the surface of water or MMYE was added to each tube, which were then sealed with Parafilm<sup>®</sup> and incubated at 25 °C.

## **Results**

### ***Radial growth***

CLED and CMA showed the lowest growth halo in 24 hours, with a colony growth diameter of 1.6 and 2.3 cm, respectively. The V8 agar and its analogue replaced with beetroot juice showed intermediate growth with diameters of 2.4 and 2.8 cm, respectively. The blood, chocolate and egg yolk agar showed the highest radial mycelium growth, with diameters of 3.2, 3.5 and 3.6 cm, respectively. The radial growth resulted of the average of 3 measurements performed under the same growth conditions.

### ***Zoosporogenesis***

The zoospores count with the induction of zoosporogenesis with CHO, CMA, CMAYE and YEA are presented in Figure 1. Using the previously incubation on CHO we found that all the protocols used allowed the induction of zoosporogenesis. Protocol 5, which was used an initial 24h incubation in YEA and new 24-hour incubation in YEA with pieces of grass before moving parasitized grasses to the IM, was the protocol which yielded the highest score of zoospores / mL in evaluated conditions (Figure 1).

After this initial observation, we evaluated the use of CHO or EYA, as the first incubation media (37°C/72h), followed by protocol 5 of incubation in 8 isolates of

*P. insidiosum* (Table 2). Similarly, all isolates were able to produce zoospores, indicating that both rich media can be used in recovery / induction of zoosporogenesis.

### ***Preservation methods***

The seventeen *P. insidiosum* maintained in tubes containing distilled water or MMYE with pieces of grasses were incubated by seven months at 25°C. After this period, pieces of grass were transferred to YEA and incubated at 37°C up to 96h. Among the samples preserved in MMYE, 13 isolates (80%) showed characteristic growth of *P. insidiosum*. Furthermore, all the *P. insidiosum* isolates maintained in distilled water showed growth in YEA when they were incubated at 37 °C. All strains recovered were able to produce zoospores *in vitro*.

## **4. Discussion**

A comparison of radial mycelium growth showed that culture media containing animal derivative components (BLA, CHO and EYA) provided a greater radial growth of *P. insidiosum* than the culture media containing plant derivatives (CMA, V8A and BJA). The lower radial growth in CLED demonstrated the lower ability of *P. insidiosum* grow on media poor in electrolytes and containing lactose and cysteine.

Disregarding the complexity of most nutritional media tested and because *Pythium* spp. not contain metabolic pathways for the synthesis of ergosterol and use sterols from the environment [22], it is possible that *P. insidiosum* can more effectively metabolize cholesterol from blood and from egg yolk than the phytosterols contained in the culture media enriched with plant derivatives, which result in faster growth and induction of reproduction, similar to that previously described by Hendrix [23] to other Oomycetes species. The use of commercial egg yolk (Oxoid) did not provide a good mycelium growth (data not shown) as seen using a

fresh egg yolk, probably by use of preservatives in their composition that can interfere with the mycelium growth.

Induction of zoosporogenesis is based on the parasitism of plant fragments in a nutrient-poor medium, followed by incubation of the plant fragments in an IM containing  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{K}^+$ , temperature and pH appropriate [14, 24-25]. In this study, the maximum number of zoospores was obtained by preincubation of the isolates on CHO followed by subsequent 24h two cycles of subculturing on YEA.

The number of produced zoospores, as well as the incubation time is dependent on the medium used in the growth of *P. insidiosum* before the process of induction of zoosporogenesis [14, 25]. Shipton [24] describes that the presence of young hyphae is the determining factor for the abundant formation of zoospores and that the previous period of growth that is considered optimal for the production of zoospores is between 24 and 30 hours of incubation.

Mendoza & Prendas [14] showed that the maximum number of zoospores was obtained after an hour and a half of incubation in the induction medium at 37°C when used previous culture with grass pieces on 2% water agar for 24 hours at 37°C. But when the culture of grass fragments was carried out on other media such as Sabouraud dextrose agar and CMA, the incubation time was four days at 37°C and the period of increased production of zoospores in IM occurred after 5 hours and half of incubation at 37°C. However, as noted by Pereira *et al.* [26], *P. insidiosum* isolates submitted to subsequent cycles of subculturing over long periods may lose the ability to grow on 2% water agar and may have reduced production of zoospores on the CMA.

The addition of yeast extract in the process of induction of zoosporogenesis was previously used by Bentinck-Smith *et al.* [16] to identify the agent pythiosis in two dogs. The technique was based on the transfer of blocks of the agar medium with vegetative growth of

*P. insidiosum* to plates with water fortified with yeast extract (1%) and pieces of grass. However, the quantification of zoospores produced was not reported. In addition, the production of large numbers of zoospores ( $10^6$  ml<sup>-1</sup>) by *Aphanomyces cochlioides* was dependent on the concentration of yeast extract added to the CMA [27].

In this context, it is suggested that the zoosporogenesis *in vitro* can be re-established or increased by previous culturing of *P. insidiosum* on nutrient-rich media that best stimulate mycelium growth (represented here by CHO or EYA) followed by subculture on nutrient-poor media that enable rapid growth and consequent mycelium parasitism of plant sources (represented here by YEA). Furthermore, the maximum number of zoospores obtained from *P. insidiosum* isolates recently recovered from pythiosis cases probably require a shorter incubation time on a nutrient-rich media and greater number of subcultures on YEA before the induction of plant parasitism.

In addition to the mycelium growth restriction (low availability of nutrients), the induction of zoosporogenesis also can be affected by a variety of environmental factors including temperature (and cold shock), light, aeration, humidity, carbon, nitrogen and ions compounds [24-25, 28-30]. Studies of these factors in the induction of zoosporogenesis in *P. insidiosum* deserve attention.

The storage of fungi for long periods of time may change morphophysiological characteristics that alter its viability and sporulation capacity with consequent attenuation or loss of virulence [31-33]. The virulence of many fungi is related to changes of cell wall components, inability to secrete proteases and express some proteins and temperature sensitivity [34]. The viability and virulence can be maintained or restored by experimental animal infections [35] and culture conditions [36-37]. While not a true fungus, the morphological similarities of *P. insidiosum* to suggest that similar mechanisms for the conservation of fungi can be used in the conservation of this oomycete.



In our study, the addition of grass fragments to water or MMYE provides a support for the fragile mycelium growth and a favorable environment for parasitism of the grass fragments by *P. insidiosum* and possibly the production of zoospores and renewal of the mycelium. In addition, the low cost and excellent recovery of the isolates in distilled water with the addition of pieces of grass to show an advantage in comparison with other techniques effective, but costly, as the conservation at -70° C and fungal lyophilization [38-39].

In conclusion, we describe that the production of zoospores *in vitro* by isolates of *P. insidiosum* can be re-established or increased using a sequence of subcultures in chocolate agar (or egg yolk agar) and 0.2% yeast extract agar. Currently, we do not know the exact mechanism by which this nutritional change in the culture medium stimulates zoosporogenesis in *P. insidiosum*, but it is suggested that the previously culture in a medium rich in certain nutrients, allowing the accumulation of nutritional reserves needed for reproduction in conditions of nutritional deficiency.

## 5. References

- 1 De Cock AW, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. *J Clin Microbiol* 1987; **25**: 344-9.
- 2 Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2967-73.
- 3 Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infection caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *J Mycol* 1996; **6**: 151-64.
- 4 Kaufman L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. *Mycopathologia* 1998; **143**: 3-7.
- 5 Rivierre C, Laprie C, Guiard-Marigny O, Bergeaud P, Berthelemy M, Guillot J. Pythiosis in Africa. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 479-81.
- 6 Dykstra MJ, Sharp NJ, Olivry T, et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. *Med Mycol* 1999; **37**: 427-33.
- 7 Santurio JM, Monteiro AB, Leal AT, Kommers GD, de Sousa RS, Catto JB. Cutaneous Pythiosis insidiosii in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia* 1998; **141**: 123-5.
- 8 Thomas RC, Lewis DT. Pythiosis in dogs and cats. *Compend Small Anim* 1998; **20**: 63-74.
- 9 Tabosa IM, Riet-Correa F, Nobre VM, Azevedo EO, Reis-Junior JL, Medeiros RM. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. *Vet Pathol* 2004; **41**: 412-5.
- 10 Camus AC, Grooters AM, Aquilar RE. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. *J Vet Diagn Invest* 2004; **16**: 567-71.

- 11 Grooters AM. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; **33**: 695-720.
- 12 Pesavento PA, Barr B, Riggs SM, Eigenheer AL, Pamma R, Walker RL. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. *Vet Pathol* 2008; **45**: 538-41.
- 13 Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Kasitanon N, Thamprasert K, Vanittanakom N. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2003; **33**: 204-14.
- 14 Mendoza L, Prendas J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. *Mycopathologia* 1988; **104**: 59-62.
- 15 Santurio JM, Leal AT, Leal AB, et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosi developed and evaluated. *Vaccine* 2003; **21**: 2535-40.
- 16 Bentinck-Smith J, Padhye AA, Maslin WR, Hamilton C, McDonald RK, Woody BJ. Canine pythiosis--isolation and identification of *Pythium insidiosum*. *J Vet Diagn Invest* 1989; **1**: 295-8.
- 17 Pereira DI, Santurio JM, Alves SH, et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 1168-71.
- 18 Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 767-9.
- 19 Cavalheiro AS, Zanette RA, Spader TB, et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol* 2009; **137**: 408-11.
- 20 Chaiprasert A, Samerpitak K, Wanachiwanawin W, Thasnakorn P. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. *Mycoses* 1990; **33**: 317-23.
- 21 Grooters AM, Gee MK. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J Vet Intern Med* 2002; **16**: 147-52.
- 22 Galanina LA, Konova IV. Effect of exogenous sterols on the growth and fatty acid composition of the oomycete *Pythium debaryanum*. *Microbiology+* 2000; **69**: 530-5.
- 23 Hendrix JW. Sterol Induction of Reproduction and Stimulation of Growth of *Pythium* and *Phytophthora*. *Science* 1964; **144**: 1028-9.
- 24 Shipton WA. Zoospore induction and release in a *Pythium* causing equine phycomycosis. *Trans Br Mycol Soc* 1985; **84**: 147-55.
- 25 Shipton WA. *Pythium destruens* sp. nov., an agent of equine pythiosis. *J Med Vet Mycol* 1987; **25**: 137-51.
- 26 Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Cavalheiro AS, Ferreira L. *In vitro* zoosporogenesis among oomycetes *Pythium insidiosum* isolates. *Ciênc rural* 2008; **38**: 143-7.
- 27 Islam T, Sakasai M, Hashidoko Y, Deora A, Sakihama Y, Tahara S. Composition of culture medium influences zoosporogenesis and differentiation of *Aphanomyces cochlioides*. *J Gen Plant Pathol* 2007; **73**: 324-9.
- 28 Child JJ, Defago G, Haskins RH. The influence of carbon and nitrogen nutrition on growth and sterol-induced sexuality of *Pythium* sp. PRL 2142. *Mycologia* 1969; **61**: 1096-105.
- 29 Wulff EG, Pham ATH, Chérif M, Rey P, Tirilly Y, Hockenhull J. Inoculation of cucumber roots with zoospores of mycoparasitic and plant pathogenic *Pythium* species: Differential zoospore accumulation, colonization ability and plant growth response. *Eur J Plant Pathol* 1998; **104**: 58-76.
- 30 Walkera CA, van West P. Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biol Rev* 2007; **21**: 10-8.

- 31 de Moraes-Borba C, Rodrigues DF. Viability and sporulating capability of *Coelomyces* preserved under a range of different storage regimes. *Rev Iberoam Micol* 2000; **17**: 142-5.
- 32 da Silva AM, Borba CM, de Oliveira PC. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. *Mycoses* 1994; **37**: 165-9.
- 33 Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. *Mycopathologia* 1990; **109**: 13-7.
- 34 Hogan LH, Klein BS. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infection & Immunity* 1994; **62**: 3543-6.
- 35 Mendes da Silva AM, Borba CM, de Oliveira PC. Inoculation experimental animals with *Paracoccidioides brasiliensis* strains: an attempt to reestablish the dimorphic process and variation in pathogenicity as a function of time of preservation under mineral oil. *Mycopathologia* 1996; **133**: 135-8.
- 36 Fernandes KS, Mathews HL, Lopes Bezerra LM. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *J Med Microbiol* 1999; **48**: 195-203.
- 37 De Moraes Borba C, Schaffer GM. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses* 2002; **45**: 174-9.
- 38 Schipper MA, Bekker-Holtman J. Viability of lyophilized fungal cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1976; **42**: 325-8.
- 39 Pasarell L, McGinnis MR. Viability of Fungal Cultures Maintained at -70°C. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 1000-4.

Table 1 - Zoosporogenesis protocols

Initial incubation	Protocol	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
CHO*	1	⇒ CMA	→ YEA + grass	→ IM	zc
	2	⇒ CMA	→ CMAYE + grass	→ IM	zc
	3	⇒ CMAYE + grass	→ IM	zc	
	4	⇒ YEA + grass	→ IM	zc	
	5	⇒ YEA	→ YEA + grass	→ IM	zc

⇒, subculture of 1 cm<sup>2</sup> of CHO (chocolate agar) containing mycelium growth of *P. insidiosum*

→, subculture of 1 cm<sup>2</sup> of agar from previous day containing mycelium growth of *P. insidiosum*

+ grass, addition of pieces of grass around 2 cm<sup>2</sup> of the subcultured block agar, before new incubation

→ IM, transfer of the pieces of grass parasited with *P. insidiosum* for new Petri dish containing 20 mL of IM

zc, zoospore count in a Neubauer chamber

\*, time and incubation temperature: 37°C for 72h

CMA, corn meal agar; CMAYE, corn meal agar yeast extract; YEA, yeast extract agar; IM, induction medium

Table 2. Comparison of zoosporogenesis using CHO or EYA followed the protocol 5

<i>Pythium insidiosum</i>	Zoospores / mL	
	CHO	EYA
ATCC	20.000	10.000
135	30.000	27.500
138	45.000	20.000
178	22.500	27.500
187	30.000	25.000
198	45.000	37.500
205	27.500	25.000
210	100.000	55.000

CHO, chocolate agar; EYA, egg yolk agar

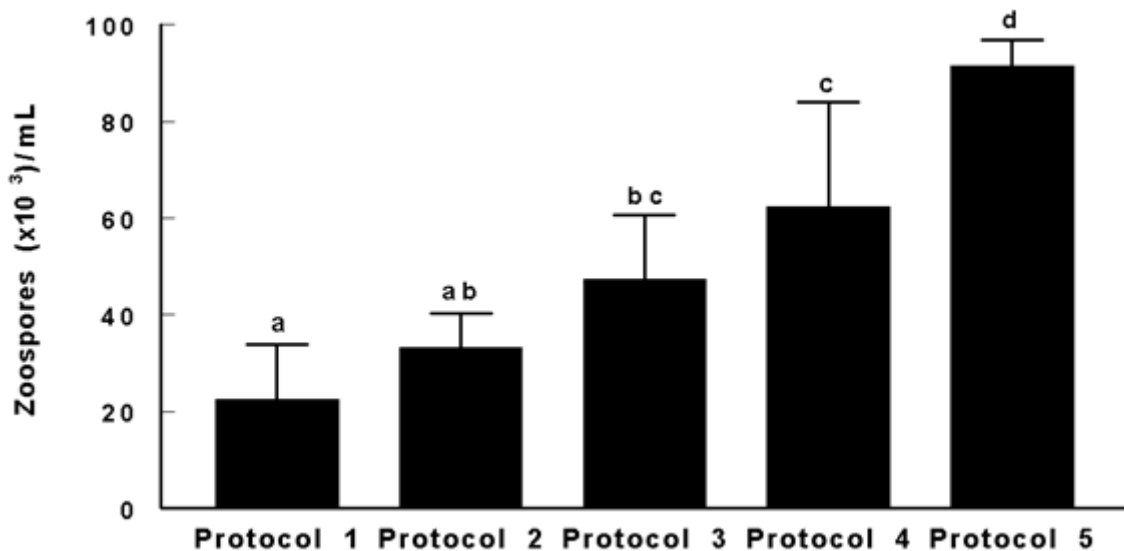


Figure 1 - Zoospores count in different protocols. Different superscripted letters appear when there is a statistical difference for one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Considerando-se a limitada disponibilidade de fármacos antifúngicos, restritos sítios de ação encontrados apenas nas células de fungos e oomicetos, o crescente aumento de infecções causadas por fungos emergentes e a resistência intrínseca ou adquirida de diversos patógenos aos fármacos disponíveis, fica evidente a necessidade da pesquisa de novas alternativas no controle e tratamento das doenças fúngicas e da pitiose.

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* do disseleneto de difenila contra *P. insidiosum*, no modelo proposto no manuscrito 1, revelou um importante caráter inibitório do crescimento de zoósporos (livres, encistados e formando hifas jovens) desta espécie, considerados os propágulos necessários para a transmissão da doença. Desconsiderando as avaliações farmacológicas específicas utilizadas para a comparação da eficácia entre fármacos, foi possível observar que a concentração de disseleneto de difenila necessária para a inibição do crescimento de *Pythium insidiosum in vitro* foi inferior a todos fármacos antifúngicos testados *in vitro* da literatura.

O uso do disseleneto de difenila no tratamento da pitiose experimental em coelhos, na dose de 10 mg/Kg/dia não se mostrou eficaz para a cura clínica dos animais (manuscrito 1). No entanto, o retardo na progressão das lesões no grupo recebendo disseleneto de difenila sugere que este composto tenha uma ação fungistática *in vivo*, na dosagem utilizada. Além disso, pesquisas futuras utilizando concentrações superiores de disseleneto de difenila e avaliações da farmacocinética deste OS podem esclarecer o papel protetor deste composto na pitiose. A ausência de alterações evidentes nos parâmetros bioquímicos e hematológicos entre os grupos com pitiose (tratados ou não com disseleneto de difenila) e os grupos controle sem a doença (tratados ou não com disseleneto de difenila) permite sugerir que este composto não apresentou toxicidade aos animais no modelo experimental desenvolvido.

O teste de suscetibilidade utilizando-se o disseleneto de difenila contra fungos potencialmente patogênicos tais como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. (manuscrito 2) demonstra a capacidade fungicida *in vitro* deste composto para a maioria das espécies testadas. A alteração da estrutura química do  $(\text{PhSe})_2$  com a introdução de grupos funcionais contendo cloro, fluor ou metoxil resultou em diminuição ou perda da atividade antifúngica comparado com a molécula de  $(\text{PhSe})_2$ . Esta redução da toxicidade contra as células fúngicas pode sugerir que haja uma reduzida toxicidade para células de animais, o que pode estimular a pesquisa de outras propriedades farmacológicas destes compostos, com menor toxicidade quando comparado com o  $(\text{PhSe})_2$ . Além disso, a elucidação do mecanismo

de ação destes OS e sua combinação com fármacos antifúngicos em busca de interações sinérgicas pode gerar novas formulações farmacêuticas mais eficientes.

A proposta do tratamento da pitiose experimental com associação de antifúngicos (manuscrito 3) resultou da observação da melhor eficácia *in vitro* de algumas combinações de fármacos quando comparadas com a utilização destes isoladamente. Apesar do mecanismo de ação da maioria dos antifúngicos ser a ação sobre o ergosterol, *P. insidiosum* (que não contém ergosterol) tem seu crescimento inibido *in vitro* por diversos antifúngicos. Esta contradição sugere que o mecanismo de ação destas drogas sobre *P. insidiosum* seja diferente do observado em fungos verdadeiros.

A constatação da inibição *in vitro* de *P. insidiosum* pelo (PhSe)<sub>2</sub> (manuscrito 1) e o insucesso terapêutico destes compostos (manuscritos 1 e 3) sugerem que *P. insidiosum* desenvolve mecanismos protetores *in vivo* que impedem ou dificultam a ação dos fármacos. Os dados da literatura suportam que a resposta imunológica "inadequada", com o recrutamento de eosinófilos e mastócitos que degranulam sobre as hifas, isolando-as (fenômeno de Hoeppli-Splendore), consiste em ação ineficiente para a destruição das hifas de *P. insidiosum*.

Os melhores resultados descritos neste trabalho *in vivo* sugere uma ação fungistática do (PhSe)<sub>2</sub> (manuscrito 1) e uma ação fungistática (e uma cura clínica) com a associação de terbinafina + fluconazol + fluvastatina (manuscrito 3). Estes dados incentivam estudos futuros buscando-se o sinergismo da combinação de OS com antifúngicos no tratamento de infecções fúngicas e da pitiose. A associação da quimioterapia com a imunoterapia representa outra abordagem para pesquisas futuras.

A observação de que a zoosporogênese *in vitro* pode ser melhor estimulada com a subcultura de *P. insidiosum* em meios de cultura diferentes (manuscrito 4) representou uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento desta pesquisa. A necessidade da produção de zoósporos para a identificação, realização dos testes de suscetibilidade e para a reprodução experimental da pitiose em coelhos está claramente descrita na literatura. No entanto, diversos isolados mantidos sob subculturas constantes no laboratório (micoteca) apresentavam uma incapacidade de produzir zoósporos pelos métodos tradicionais descritos na literatura.

A comunicação informal com outros pesquisadores mostrou que a incapacidade de induzir a zoosporogênese de isolados de micoteca é um fator limitante das pesquisas com *P. insidiosum* em outros laboratórios. Em contraste, isolados recentemente recuperados de casos de pitiose apresentam uma capacidade de crescimento e produção de zoósporos superiores aos isolados de micoteca. Sugere-se que a constante subcultura provoque uma diminuição ou

ausência de substâncias de reserva e/ou produção de metabólitos necessários para a produção de zoósporos.

## 6. CONCLUSÕES

\* O disseleneto de difenila apresenta atividade antifúngica (fungicida) *in vitro* sobre *Pythium insidiosum*.

\* O tratamento da pitiose experimental em coelhos utilizando-se disseleneto de difenila (10 mg/Kg/dia) sugere uma ação fungistática deste composto. A análise de parâmetros laboratoriais bioquímicos e hematológicos sugere ausência ou baixa toxicidade do disseleneto de difenila quando administrado por via oral.

\* O disseleneto de difenila apresenta atividade antifúngica (fungicida e fungistática) *in vitro* sobre fungos potencialmente patogênicos para humanos e animais, tais como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp.

\* A adição dos grupos funcionais contendo cloro, fluor e metoxil na molécula de disseleneto de difenila resulta na diminuição ou perda da atividade antifúngica *in vitro*.

\* O tratamento da pitiose experimental em coelhos com a combinação de antifúngicos mostrou que apenas a associação fluconazol (100 mg/Kg/dia) + terbinafina (100 mg/Kg/dia) + fluvastatina (1 mg/Kg/dia) apresentou ação fungistática e cura clínica de 1 coelho. A análise laboratorial bioquímica e hematológica sugere um envolvimento do metabolismo de ferro no curso da doença (diferenças na saturação da transferrina) e que a diminuição da concentração de leucócitos totais para níveis normais (controle) representa um bom prognóstico da doença.

\* O subcultivo sequencial de *P. insidiosum* em meios de cultura nutricionalmente ricos (ágar chocolate, ágar gema) e pobres (ágar extrato de levedura, ágar fubá) estimulam a zoosporogênese *in vitro*.

\* A conservação de isolados de *P. insidiosum* em tubos contendo água e fragmentos de grama esterilizados proporcionam a viabilidade desta espécie por longos períodos de tempo.



## **7. PERSPECTIVAS**

### **7.1. Indução de pitiose experimental em camundongos com sobrecarga de ferro**

#### 7.1.1. Objetivos

Desenvolvimento de metodologia para a indução de pitiose experimental em camundongos BALB/c com sobrecarga de ferro ou diabetes induzida.

Tratamento de camundongos BALB/c com pitiose experimental com antifúngicos, disselenetos de difenila, imunoterápico (Pitium-Vac<sup>®</sup>) e quelantes de ferro.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ACKER, C. I. et al. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: Involvement of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity. **Neuroscience Letters**, v. 455, n. 3, p. 168-172, 2009.

ALEXANDER, B. D.; PFALLER, M. A. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. S15-S27, 2006.

ANSON, B. D.; MA, J. Y.; HE, J. Q. Identifying Cardiotoxic Compounds. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, v. 29, n. 9, p. 34-35, 2009.

ANTUNES, A. G. et al. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 239-241, 2004.

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, n. 2, p. 767-769, 2008.

ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 153-158, 2001.

ASHLEY, E. S. D. Pharmacology of Azole Antifungal Agents. In: GHANNOUM, M. A. e PERFECT, J. R. (Ed.). **Antifungal therapy**. 1 ed. New York: Informa Healthcare USA, 2010. cap. 12, p.199-218.

BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Antifungal combination therapy - Clinical potential. **Drugs**, v. 65, n. 11, p. 1461-1480, 2005.

BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Combination antifungal therapy for the treatment of invasive yeast and mold infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, n. 6, p. 448-456, 2007.

BADENOCH, P. R. et al. *Pythium insidiosum* keratitis confirmed by DNA sequence analysis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 4, p. 502-503, 2001.

BALASHOV, S. V.; PARK, S.; PERLIN, D. S. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2058-2063, 2006.

BALTCH, A. L. et al. Effects of cytokines and fluconazole on the activity of human monocytes against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 96-104, 2001.

BARBOSA, N. B. D. et al. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 9, p. 655-663, 2008a.

BARBOSA, N. B. D. et al. Acute Diphenyl Diselenide Treatment Reduces Hyperglycemia But Does Not Change Delta-Aminolevulinate Dehydratase Activity in Alloxan-Induced Diabetes in Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 12, p. 2200-2204, 2008b.

BARBOSA, N. B. V. et al. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 186-194, 2008c.

BARKER, K. S. et al. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 376-385, 2004.

BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. **Current Infectious Disease Reports**, v. 8, n. 6, p. 449-456, 2006.

BEGGS, W. H. Mechanisms of Synergistic Interactions between Amphotericin-B and Flucytosine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 17, n. 4, p. 402-404, 1986.

BEGGS, W. H.; SAROSI, G. A.; WALKER, M. I. Synergistic Action of Amphotericin-B and Rifampin against *Candida* Species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 133, n. 2, p. 206-209, 1976.

BELLOCCHIO, S. et al. Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 214-222, 2005.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 2, p. 226-235, 2008.

BENNETT, J. E. et al. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 301, n. 3, p. 126-131, 1979.

BENTINCK-SMITH, J. et al. Canine pythiosis--isolation and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, n. 4, p. 295-298, 1989.

BIEN, M. et al. Antifungal activity of 2-(4-chlorophenyl)-1,2-benzisoselesazol-3(2H)-one, the analog of Ebselen. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 47, n. 3, p. 185-193, 1999.

BILLACK, B. et al. Evaluation of the antifungal and plasma membrane H(+)-ATPase inhibitory action of ebselen and two ebselen analogs in *S. cerevisiae* cultures. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 2010.

BILLACK, B.; SANTORO, M.; LAU-CAM, C. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology & Disease**, v. 15, n. 2, p. 77-83, 2009.

BORGES, L. P. et al. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, v. 210, n. 1, p. 1-8, 2005.

BORGES, L. P. et al. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 1, p. 15-25, 2008.

BORGES, L. P. et al. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 2, p. 99-107, 2006.

BORGES, V. C. et al. Disubstituted Diaryl Diselenides Inhibit [H-3]-Serotonin Uptake in Rats. **Neurotoxicity Research**, v. 15, n. 1, p. 57-61, 2009.

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

BOSSCHE, H. V. et al. Mechanisms and Clinical Impact of Antifungal Drug-Resistance. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, p. 189-202, 1994.

BRANDAO, R. et al. Diphenyl Diselenide Protects Against Hematological and Immunological Alterations Induced by Mercury in Mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 22, n. 5, p. 311-319, 2008.

BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Laboratory aspects of medical mycology. In: (Ed.). **Clinical mycology**. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2003. cap. 1, p.3-22.

BRITO, V. B. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 1, p. 125-134, 2009.

BRUNING, C. A. et al. Disubstituted diaryl diselenides inhibit delta-ALA-D and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activities in rat brain homogenates *in vitro*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 332, n. 1-2, p. 17-24, 2009.

BURGER, M. et al. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Research Bulletin**, v. 64, n. 4, p. 339-345, 2004.

BURGER, M. E. et al. Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 70, n. 2, p. 165-170, 2006.

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, n. 6, p. 567-571, 2004.

CANNON, R. D. et al. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291+, 2009.

CANTON, E.; ESPINEL-INGROFF, A.; PEMAN, J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n. 1, p. 107-119, 2009.

CAVALHEIRO, A. S. et al. *In Vitro* Activity of Terbinafine Combined with Caspofungin and Azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, 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, n. 3-4, p. 408-411, 2009b.

CENCI, E. et al. Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 1, p. 217-226, 1997.

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

CHAN, G. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of ebselen: role of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Biochemical & Molecular Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 252-264, 2007.

CHANDRA, J.; MOHAMMAD, S.; GHANNOUM, M. A. Echinocandins: Exploring Susceptibility and Resistance In: (Ed.). **Antimicrobial Drug Resistance**. 1. New York: Humana Press, v.1, 2009a. cap. 28, p.327-346.

CHANDRA, J.; MOHAMMAD, S.; GHANNOUM, M. A. Flucytosine: Site of Action, Mechanism of Resistance and Use in Combination Therapy In: (Ed.). **Antimicrobial Drug Resistance**. 1. New York: Humana Press, v.1, 2009b. cap. 27, p.313-326.

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

CLEARY, J. D.; CHAPMAN, S. W.; NOLAN, R. L. Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 5, p. 977-981, 1992.

CODISH, S. D.; TOBIAS, J. S.; HANNIGAN, M. Combined Amphotericin B-Flucytosine Therapy in *Aspergillus* Pneumonia. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 241, n. 22, p. 2418-2419, 1979.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, n. 4, p. 281-286, 1999.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 276-279, 2001.

DARKES, M. J. M.; SCOTT, L. J.; GOA, K. L. Terbinafine - A review of its use in onychomycosis in adults. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, n. 1, p. 39-65, 2003.

DE BEM, A. F. et al. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation *in vitro*. **Atherosclerosis**, v. 201, n. 1, p. 92-100, 2008.

DE BEM, A. F. et al. Diphenyl Diselenide Decreases Serum Levels of Total Cholesterol and Tissue Oxidative Stress in Cholesterol-fed Rabbits. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 105, n. 1, p. 17-23, 2009.

DE BEM, A. F. et al. Low toxicity of diphenyl diselenide in rabbits: A long-term study. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 47-55, 2007.

DE BEM, A. F. et al. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. **Chemico-Biological Interactions**, v. 162, n. 1, p. 1-10, 2006.

DREW, R. H. Flucytosine. In: GHANNOUM, M. A. e PERFECT, J. R. (Ed.). **Antifungal therapy**. 1 ed. New York: Informa Healthcare USA, 2010a. cap. 11, p.184-198.

DREW, R. H. Polyenes for Prevention and Treatment of Invasive Fungal Infections. In: GHANNOUM, M. A. e PERFECT, J. R. (Ed.). **Antifungal therapy**. 1 ed. New York: Informa Healthcare USA, 2010b. cap. 10, p.163-183.

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

ERNST, E. J. Susceptibility Testing Methods of Antifungal Agents. In: ERNST, E. J. e ROGERS, P. D. (Ed.). **Antifungal agents : methods and protocols**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005. cap. 1, p.3-12. (Methods in molecular medicine).

FREITAS, A. S. et al. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 1, p. 77-84, 2009.

GARNICA, M.; NUCCI, M. Emerging Fungal Infections. **Annales Nestlé**, v. 67, p. 133-139, 2009.

GERAGHTY, P.; KAVANAGH, K. Erythromycin, an inhibitor of mitoribosomal protein biosynthesis, alters the amphotericin B susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of Pharmacy & Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 179-184, 2003.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: Putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1508-1515, 2008.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoccontent. **Brain Research**, v. 986, n. 1-2, p. 196-199, 2003.

GRAMINHA, M. A. S. et al. Terbinafine resistance mediated by salicylate 1-monooxygenase in *Aspergillus nidulans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3530-3535, 2004.

GRAYBILL, J. R. Antifungal drugs and resistance. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 390, p. 217-234, 1995.

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

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

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. J. Antifungal therapy. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R., et al (Ed.). **Clinical mycology**. 2nd. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. cap. 7, p.161-195.

HASSAN, W. et al. Effects of acidosis and Fe (II) on lipid peroxidation in phospholipid extract: Comparative effect of diphenyl diselenide and ebselen. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 152-154, 2009.

HITCHCOCK, C. A. Resistance of *Candida albicans* to Azole Antifungal Agents. **Biochemical Society Transactions**, v. 21, n. 4, p. 1039-1047, 1993.

HOWARD, S. J. et al. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1068-1076, 2009.

IDEMYOR, V. Emerging opportunistic fungal infections: Where are we heading? **Journal of the National Medical Association**, v. 95, n. 12, p. 1211-1215, 2003.

INEU, R. P. et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 3023-3029, 2008.

JESSE, C. R. et al. Further analysis of the antinociceptive action caused by *p*-methoxydiphenyl diselenide in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 573-580, 2009.

JESSUP, C. J.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. **Medical Mycology**, v. 38, n. 2, p. 155-159, 2000.

JOHNSON, M. D.; MOHR, J. Echinocandins for Prevention and Treatment of Invasive Fungal Infections. In: GHANNOUM, M. A. e PERFECT, J. R. (Ed.). **Antifungal therapy**. 1 ed. New York: Informa Healthcare USA, 2010. cap. 13, p.219-242.

KADE, I. J. et al. Studies on the antioxidant effect and interaction of diphenyl diselenide and dicholesteroyl diselenide with hepatic delta-aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 1, p. 14-20, 2009.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1135-1144, 2002.

KRAJAEJUN, T. et al. Development of an Immunochromatographic Test for Rapid Serodiagnosis of Human Pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 4, p. 506-509, 2009.

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

KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 569-576, 2006.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9 ed. São Paulo ; São Paulo: Sarvier, 2002. p. 1-41.

LAMOUR, K.; KAMOUN, S. *Pythium insidiosum* and Mammalian Hosts. In: (Ed.). **Oomycete Genetics and Genomics : Diversity, Interactions and Research Tools**. 1 ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2009. cap. 19, p.387-405.

LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular Pythiosis in a Thalassemic Patient. **Vascular**, v. 17, n. 4, p. 234-238, 2009.

LEBER, R. et al. Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3890-3900, 2003.

LEWIS, R. E.; KLESPER, M. E.; PFALLER, M. A. Combination systemic antifungal therapy for cryptococcosis, candidiasis, and aspergillosis. **Journal of Infectious Disease Pharmacotherapy**, v. 3, p. 61-82, 1999.

LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Rationale for combination antifungal therapy. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 8, p. 149s-164s, 2001.

LIU, W. et al. Extra copies of the *Aspergillus fumigatus* squalene epoxidase gene confer resistance to terbinafine: Genetic approach to studying gene dose-dependent resistance to antifungals in *A. fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2490-2496, 2004.



LOCKHART, S. R.; DIEKERNA, D. J.; PFALLER, M. A. The epidemiology of fungal infections. In: (Ed.). **Clinical mycology**. 2nd. [Edinburgh]: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. cap. 1, p.1-14.

LUCHESE, C. et al. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicology Letters**, v. 173, n. 3, p. 181-190, 2007a.

LUCHESE, C. et al. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. **Toxicology**, v. 230, n. 2-3, p. 189-196, 2007b.

LUCHESE, C. et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: Involvement of glutathione. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 2009.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 76-81, 2002.

MACCALLUM, D. M. et al. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, no prelo, 2010.

MANASTIR, L.; ERGON, M. C.; YUCESYOY, M. Investigation of mutations in Erg11 gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. **Mycoses**, 2009.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.

MCNEIL, M. M. et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 641-647, 2001.

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 and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 6, p. 477-486, 2005.

MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**, v. 47, n. 1-2, p. 14-23, 2004.

MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v. 104, n. 1, p. 59-62, 1988.

MENDOZA, L.; VILELA, R. Anomalous fungal and fungal-like infections: lacaziosis, pythiosis, and rhinosporidiosis. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R., et al (Ed.). **Clinical mycology**. 2nd. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. cap. 18, p.403-415.

MEOTTI, F. C. et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 1, p. 9-16, 2003.

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

MONTES, B.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. New fungal classification and their applications in medicine. **Biomedica**, v. 23, n. 2, p. 213-224, 2003.

MUGESH, G.; DU MONT, W. W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 7, p. 2125-2179, 2001.

MURDOCH, D.; PARR, D. *Pythium insidiosum* keratitis. **Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology**, v. 25, n. 2, p. 177-179, 1997.

NARAJI, C.; KARVEKAR, M. D.; DAS, A. K. Biological importance of organoselenium compounds. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 69, n. 3, p. 344-351, 2007.

NEGRI, M. et al. Correlation Between Etest (R), Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species From Infection and Colonization. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, n. 5, p. 324-330, 2009.

NGUYEN, M. H. et al. The changing face of candidemia: Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **American Journal of Medicine**, v. 100, n. 6, p. 617-623, 1996.

NOGUEIRA, C. W.; BORGES, L. P.; SOUZA, A. C. G. Oral administration of diphenyl diselenide potentiates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 156-164, 2009.

NOGUEIRA, C. W. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflammation Research**, v. 52, n. 2, p. 56-63, 2003.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255-6285, 2004.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Combination antifungal therapy: a critical review of the evidence. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 65-70, 2008.

PAUL, S. M. et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 203-214, 2010.

PEREIRA, D. I. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 1168-1171, 2007.

PEREIRA, D. I. et al. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. **Veterinary Research Communication**, v. 34, n. 3, p. 301-306, 2010.

PEREIRA, D. I. B. et al. *In vitro* zoosporogenesis among oomycetes *Pythium insidiosum* isolates. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 1, p. 143-147, 2008.

PESAVENTO, P. A. et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 4, p. 538-541, 2008.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 435-447, 2006a.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. S3-S14, 2006b.

PINTO, L. G. et al. Evidence for the involvement of glutamatergic and GABAergic systems and protein kinase A pathway in the antinociceptive effect caused by *p*-methoxy-diphenyl diselenide in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 4, p. 487-496, 2008.

POOLE, H. M.; BRASHIER, M. K. Equine cutaneous pythiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 3, p. 229-235, 2003.

POSSER, T. et al. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Research**, v. 1199, p. 138-147, 2008.

POSSER, T. et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: An *in vitro* evaluation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, n. 1-2, p. 126-135, 2006.

PRIGOL, M. et al. *m*-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide attenuates pentylentetrazole-induced seizures in mice by inhibiting GABA uptake in cerebral cortex slices. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 6, p. 1127-1133, 2009a.

PRIGOL, M. et al. Protective effect of disubstituted diaryl diselenides on cerebral oxidative damage caused by sodium nitroprusside. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 2, p. 94-99, 2009b.

PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 4, p. 216-222, 2009c.

PRIGOL, M. et al. Diphenyl diselenide-induced seizures in rat pups: Possible interaction with glutamatergic system. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 6, p. 996-1004, 2008.

PUNTEL, R. L. et al. Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: Effect of

diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. **Chemico-Biological Interactions**, v. 165, n. 2, p. 87-98, 2007.

RAVISHANKAR, J. P. et al. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, n. 3, p. 167-175, 2001.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.

REX, J. H.; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard**. 2nd. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a. x, 35 p.

REX, J. H.; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : approved standard**. 3rd. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b. viii, 25 p.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 982-989, 2002.

RICHARDSON, M.; LASS-FLORL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 5-24, 2008.

ROSA, R. M. et al. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. **Life Sciences**, v. 77, n. 19, p. 2398-2411, 2005.

ROSA, R. M. et al. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, n. 1, p. 44-54, 2007a.

ROSA, R. M. et al. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 10, p. 1287-1304, 2007b.

ROSA, R. M. et al. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 563, n. 2, p. 107-115, 2004.

RYDER, N. S. Terbinafine - Mode of Action and Properties of the Squalene Epoxidase Inhibition. **British Journal of Dermatology**, v. 126, p. 2-7, 1992.

SANTOS, F. W. et al. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicology Letters**, v. 152, n. 3, p. 255-263, 2004.

SANTOS, F. W. et al. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 12, p. 1723-1730, 2005a.

SANTOS, F. W. et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chemico-Biological Interactions**, v. 151, n. 3, p. 159-165, 2005b.

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

SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. **Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica**. 1 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008. 111p.

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

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

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

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C. R.; NOGUEIRA, C. W. Caffeine and a selective adenosine A(2B) receptor antagonist but not imidazoline receptor antagonists modulate antinociception induced by diphenyl diselenide in mice. **Neuroscience Letters**, v. 436, n. 2, p. 120-123, 2008a.

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C. R.; NOGUEIRA, C. W. Structural modifications into diphenyl diselenide molecule do not cause toxicity in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 271-276, 2009.

SAVEGNAGO, L. et al. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 4, p. 418-426, 2008b.

SAVEGNAGO, L. et al. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, n. 6, p. 1261-1269, 2007a.

SAVEGNAGO, L. et al. Mechanisms involved in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide in the formalin test. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 12, p. 1679-1686, 2008c.

SAVEGNAGO, L. et al. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, n. 2-3, p. 129-138, 2007b.

SAVEGNAGO, L. et al. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide. **Brain Research**, v. 1162, p. 32-37, 2007c.

SAVEGNAGO, L. et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 86-92, 2006.

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.

SHEEHAN, D. J.; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts : approved guideline**. Wayne, Pa.: NCCLS, 2004. viii, 23 p.

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

SOTEROPOULOS, P. et al. Molecular characterization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2349-2355, 2000.

STANGHERLIN, E. C. et al. Passive smoke exposure induces oxidative damage in brains of rat pups: Protective role of diphenyl diselenide. **Inhalation Toxicology**, v. 21, n. 8-11, p. 868-874, 2009.

SUGAR, A. M. Use of Amphotericin-B with Azole Antifungal Drugs - What Are We Doing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 1907-1912, 1995.

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

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

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

THOMAS, R. C.; LEWIS, D. T. Pythiosis in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 1, p. 63-75, 1998.

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

TROST, M. E. et al. Clinical, morphologic and immunohistochemical aspects of canine gastrointestinal pythiosis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 673-679, 2009.

VANDEPUTTE, P. et al. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 982-990, 2007.

VANDERHORST, C. M. et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 1, p. 15-21, 1997.

VANDIJCK, D. et al. Candidemia in critically ill patient: An analysis of daily antifungal therapy related costs. **Journal De Mycologie Medicale**, v. 18, n. 2, p. 96-99, 2008.

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 for mold infections: Much ado about nothing? **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 12, p. 1889-1901, 2008.

VIRGILE, R. et al. Human Infectious Corneal Ulcer Caused by *Pythium insidiosum*. **Cornea**, v. 12, n. 1, p. 81-83, 1993.

VORA, S. et al. Activity of voriconazole, a new triazole, combined with neutrophils or monocytes against *Candida albicans*: Effect of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 907-910, 1998.

WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3613-3621, 2004.

WILHELM, E. A. et al. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Pathophysiology**, v. 16, n. 1, p. 31-37, 2009a.

WILHELM, E. A.; JESSE, C. R.; NOGUEIRA, C. W. Protective effect of *p*-methoxyl-diphenyl diselenide in lethal acute liver failure induced by lipopolysaccharide and d-galactosamine in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 6, p. 727-734, 2009b.

WILHELM, E. A. et al. Introduction of trifluoromethyl group into diphenyl diselenide molecule alters its toxicity and protective effect against damage induced by 2-nitropropane in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, n. 3, p. 197-203, 2009c.

WILSON, E.; THORSON, L.; SPEERT, D. P. Enhancement of Macrophage Superoxide Anion Production by Amphotericin-B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 5, p. 796-800, 1991.

WIRTH, T. **Organoselenium Chemistry: Modern Developments in Organic Synthesis**. Berlin: Springer Berlin / Heidelberg, 2000. 272 p.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

WOJTOWICZ, H. et al. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. **II Farmaco**, v. 59, n. 11, p. 863-868, 2004.

ZASSO, F. B. et al. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.