

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Juliana Simoni Moraes Tondolo

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE *Pythium insidiosum* E ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A
*Conidiobolus lamprauges***

Santa Maria, RS
2016

Juliana Simoni Moraes Tondolo

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE *Pythium insidiosum* E
ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A *Conidiobolus lamprauges***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**

Orientador: Janio Moraes Santurio

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tondolo, Juliana Simoni Moraes
ASPECTOS FISIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE *Pythium insidiosum* E ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS FRENTES A *Conidiobolus lamprauges* / Juliana Simoni Moraes Tondolo.- 2016.
134 p.; 30cm

Orientador: Janio Moraes Santurio
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. *Conidiobolus lamprauges* 2. *Pythium insidiosum* 3. Beta-glucanas 4. Imunoterapia I. Santurio, Janio Moraes II. Título.

Juliana Simoni Moraes Tondolo

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE *Pythium insidiosum* E
ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A *Conidiobolus lamprauges***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**

Aprovado em 28 de março de 2016:

Janio Morais Santurio, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dr^a. (UFSM)

Débora Alves Nunes Mario, Dr^a. (IMED)

Régis Adriel Zanette, Dr. (UFRGS)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da segunda chance e ao Dr. Waldir Veiga Pereira por ser o portador dessa dádiva e pela sua dedicação ferrenha na luta contra o câncer.

Ao meu amado esposo, parceiro e amigo Érico Silva de Loreto, teu amor, teu apoio e nossa vitória são motivos de uma felicidade indescritível. Teu carinho e dedicação foram essenciais em ambas as conquistas.

À minha família, pais, irmãos, sogros e cunhados, que sempre estiveram presentes, incentivando, acreditando, torcendo e ajudando, mesmo com um simples sorriso, um abraço. Quem tem uma família unida, nunca estará só e vencerá sempre.

Aos professores Janio Moraes Santurio e Sydney Hartz Alves pelo apoio, paciência e compreensão para a realização deste trabalho. A dedicação, seriedade e a paixão pela ciência que vocês transpiraram têm caráter exemplar. Obrigado pela atenção que sempre recebi em todos os nossos encontros.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI). Sou grata pela ajuda e presteza que sempre recebi de todos.

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

*Eu não me envergonho de corrigir meus
erros e mudar as opiniões, porque não me
envergonho de raciocinar e aprender.*

(Alexandre Herculano)

RESUMO

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE *Pythium insidiosum* E ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A *Conidiobolus lamprauges*

AUTORA: Juliana Simoni Moraes Tondolo

ORIENTADOR: Janio Morais Santurio

A conidiobolomicose e a pitiose são infecções importantes que acometem animais e humanos e que apresentam dificuldades tanto no diagnóstico quanto no tratamento. A conidiobolomicose é causada pelos fungos *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus* e *C. lamprauges*, afetando ovinos, equinos, caninos e humanos, já a pitiose é causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* e atinge mamíferos selvagens e domésticos, principalmente equinos, e humanos. Não existe uma abordagem farmacológica padrão para o tratamento dessas infecções e em ambos os casos a ressecção cirúrgica é uma abordagem muitas vezes necessária. Neste contexto, esta tese objetivou (a) determinar a suscetibilidade *in vitro* de *C. lamprauges* frente a diferentes fármacos antimicrobianos, bem como identificar possíveis associações sinérgicas; (b) padronizar o uso da técnica de disco difusão utilizando a minociclina como um método de screening para a identificação presuntiva de *P. insidiosum*; (c) quantificar, extrair e avaliar o potencial imunomodulador das β-glucanas de *P. insidiosum* *in vitro* em cultivo de linfócitos e *in vivo* em camundongos; (d) desenvolver um modelo experimental de pitiose em camundongos e avaliar a resposta imunológica à infecção. Como resultados obtivemos: i) na avaliação da suscetibilidade *in vitro* de *C. lamprauges* isolados de infecções em ovinos, observou-se uma suscetibilidade reduzida a maioria dos fármacos testados, sendo a terbinafina o fármaco com melhor atividade ($CIM < 0,06-0,5 \mu\text{g/mL}$). As maiores taxas de sinergismo foram observadas com a associação de sulfametoxazol com trimetoprima (100%) e entre terbinafina com fármacos antifúngicos azólicos (71%); ii) a padronização do uso da técnica de disco difusão com discos de minociclina como um método de screening para a identificação presuntiva de *P. insidiosum* mostrou-se eficaz, pois não houve crescimento miceliano de *P. insidiosum* em torno do disco de minociclina durante os sete dias de incubação, diferenciando-o assim de *C. lamprauges* e outros fungos verdadeiros; iii) o conteúdo de β-glucanas de *P. insidiosum* avaliado enzimaticamente foi de $23,09\% \pm 3,71$ de glucanas totais, divididas em α-glucanas ($4,10\% \pm 0,83$) e β-glucanas ($18,99\% \pm 3,59$); iv) a extração de β-glucanas de *P. insidiosum* produziu um extrato contendo 82% de β-glucanas e 18% de aminoácidos e peptídeos residuais e a análise estrutural mostrou tratar-se de uma (1,3)(1,6)-β-glucana; v) esta (1,3)(1,6)-β-glucana demonstrou potencial para estimular o sistema imune *in vitro* observado pelo aumento na proliferação de linfócitos de equinos, humanos e camundongos e de induzir resposta do tipo Th17 quando administrada aos camundongos; vi) o uso de camundongos BALB/c imunossuprimidos com a associação de ciclofosfamida e hidrocortisona mostrou ser um modelo experimental eficaz para o estudo da pitiose, com mortalidade de 60% dos animais infectados; vii) a produção de citocina observada durante o desenvolvimento da pitiose experimental em camundongos caracterizou-se pela expressão de IL6, IL-10 e TNF-α, indicando uma resposta inflamatória e uma possível supressão da resposta imune do hospedeiro como responsável pelo estabelecimento da infecção.

Palavras-chave: *Conidiobolus lamprauges*, suscetibilidade, β-glucanas, imunoterapia, *Pythium insidiosum*.

ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF *Pythium insidiosum* AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL AGENTS AGAINST *Conidiobolus lamprauges*

AUTHOR: Juliana Simoni Moraes Tondolo
ADVISOR: Janio Morais Santurio

Conidiobolomycosis and pythiosis are important infections that affect animals and humans, which presents difficulties in diagnosis and treatment. The conidiobolomycosis is caused by the fungi *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus* and *C. lamprauges*, affecting sheep, horses, dogs and humans; pythiosis is caused by the oomycete *Pythium insidiosum* and affects wild and domestic mammals, particularly horses and humans. There is no standard pharmacological approach to the treatment of infections and the surgical resection is a method often needed in both cases. In this context, this thesis aimed to (a) determine the *in vitro* susceptibility of *C. lamprauges* against different antimicrobial drugs, as well as identify possible synergistic associations; (b) the use of standardized disk diffusion technique with minocycline as a screening method for the presumptive identification of *P. insidiosum*; (c) quantify, extract and evaluate the immunomodulatory potential of β -glucans from *P. insidiosum* *in vitro* in cell cultures *in vitro* and in mice; (d) develop an experimental pythiosis model in mice and evaluate the immune response to infection. As results we achieved: i) assessing the *in vitro* susceptibility of *C. lamprauges* isolated from sheep infections, there is reduced susceptibility to most antimicrobial drugs tested, with terbinafine the drug with improved activity ($MIC < 0.06$ - $0.5 \mu\text{g/mL}$). The highest rates of synergism were observed with the combination of sulfamethoxazole and trimethoprim (100%) and between the terbinafine with azole antifungal drugs (71%); ii) the standardization of the use of disk diffusion technique with minocycline disks as a screening method for the presumptive identification of *P. insidiosum* was effective because there was no mycelial growth of *P. insidiosum* around the minocycline disk during the seven days of incubation, thus differentiating it from *C. lamprauges* and other true fungi; iii) β -glucan content from *P. insidiosum* enzymatically assessed was $23.09 \pm 3.71\%$ of total glucan, divided into α -glucans ($4.10 \pm 0.83\%$) and β -glucans ($18.99 \pm 3.59\%$); iv) β -glucan extract from *P. insidiosum* yielded an extract containing 82% of β -glucans and 18% of residual amino acids and peptides, and the structural analysis revealed that it was a (1,3)(1,6)- β -glucan; This (1,3)(1,6)- β -glucan demonstrates a potential to stimulate the immune system *in vitro*, as observed by the increase in equine, human and mouse lymphocyte proliferation and ability to induce Th17 type response when administered to mice; vi) the use of BALB/c mice immunosuppressed with cyclophosphamide and hydrocortisone association was shown to be an effective experimental model for the study of pythiosis, with 60% of mortality; vii) The cytokine production observed during the development of the experimental pythiosis in mice was characterized by an expression of IL6, IL-10 and TNF- α , indicating an inflammatory response and possible suppression of the host immune response as responsible for the infection property.

Key words: *Conidiobolus lamprauges*, susceptibility, β -glucans, immunotherapy, *Pythium insidiosum*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Apresentação

Figura 1 - Proposta do mecanismo patogênico envolvido durante a infecção natural e mecanismo induzido pela imunoterapia.	29
Figura 2 - Relação entre os componentes da parede de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
Figura 3 - Estrutura das β -glucanas.	35

Manuscrito 2

Figure 1 - ^1H NMR spectrum of the hydrolyzed polysaccharide from <i>P. insidiosum</i> . Integration and identification of the carbohydrate region revealed Glc as major component. The carbohydrate content was estimated and quantified $\sim 81.7\%$. The chemical shifts were obtained at 600 MHz in D_2O at 303K.	84
---	----

Figure 2 - 2D edited-HSQC NMR spectrum, positive phase (black) correspond to CH and negative phase (red) correspond to CH ₂ . $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR signals of <i>P. insidiosum</i> β -Glucan were determined via COSY and HSQC.	85
---	----

Figure 3 - Changes of lymphocyte proliferation of spleen cells from equine (A), human (B) and mice (C) stimulated with β -glucan (G12.5 – G800 $\mu\text{g/mL}$), Phytohemagglutinin (PHA) or Concanavalin A (ConA) [A590 value]. Data presented as means \pm DP ($n = 5$). Different lower case letters indicate significant difference between β -glucan concentrations and cell control (RPMI) ($p < 0.01$). * indicate $P < 0.01$ in comparison with the cell control.	86
--	----

Figure 4 - Cytokine production by spleen cells from mice vaccination with 0.5, 2.5 or 5.0 mg of β -glucan extract at two weeks post treatment. Mouse spleen cells were cultured in 5% CO_2 at 37 °C in the presence of β -glucan 0.5 – 5.0 mg/mL. After incubation up to 72 h, cytokine levels in the supernatant of lymphocytes culture were measured by flow cytometry. Control group received just phosphate buffered saline (PBS). All vaccinations were given once weekly for three consecutive weeks. Each point plot represents means \pm SD ($n = 5$). * Significant difference compared to control ($p < 0.01$). Different letters indicated significant difference between treatments ($p < 0.05$).	87
---	----

Manuscrito 3

Fig. 1 - Survival of immunosuppressed mice experimentally infected by the subcutaneous route with 2×10^4 *P. insidiosum* zoospores. Mice were rendered susceptible with one dose of cyclophosphamide (CYP) 200 mg/Kg 24 h before infection (Pythiosis + CYP) or

with one dose of CYP 200 mg/Kg plus one dose of hydrocortisone acetate (HCA) 250 mg/Kg, 72 h and 24 h before infection, respectively (Pythiosis + CYP+HCA). n = 10 mice per group. Survival was monitored up to 14 days. 103

Fig. 2 – Survival of immunosuppressed mice experimentally infected by the subcutaneous route with 2×10^4 *P. insidiosum* zoospores. Mice were rendered susceptible with one dose of CYP 200 mg/Kg plus one dose of Hydrocortisone acetate (HCA) 250 mg/Kg, 72 h and 24 h before infection, respectively. n = 20 mice. Survival was monitored up to 14 days. 104

Fig. 3 - **A** and **C**. Kidney. thrombosis, necrosis and hyphae (as negative image). HE, magnification 400x. **B** and **D**. Kidney. thrombosis, necrosis and positive staining hyphae. IHC, anti-*P. insidiosum*, alkaline phosphatase-streptavidin-biotin, magnification 400x. **E**. Liver. Thrombosis and hyphae. HE, magnification 400x. **F**. Liver. Thrombosis and positive hyphae. IHC, anti-*P. insidiosum*, alkaline phosphatase-streptavidin-biotin, magnification 400x. **G**. Lung. No hyphae. HE, magnification 400x.**H**. Lesion skin. Hyphae, IHC..... 105

Fig. 4 - Cytokine secretion after mice immunosuppression and challenge with 2×10^4 *P. insidiosum* zoospores. Mouse spleen cells were incubated up to 72 h in 5% CO₂ at 37 °C, cytokine levels in the supernatant of lymphocytes culture were measured by flow cytometry. Mouse spleen cells from infected mice were cultured in the presence of β-glucan 0.1 mg/mL (P Glucan) or no stimulated (P N/S). Spleen cells of the control group were no stimulated (Healthy). Control group received just phosphate buffered saline (PBS) injection. Data are presented means ± SD (n = 5). * Significant difference compared to Healthy group (p < 0.001). 106

LISTA DE TABELAS

Apresentação

Tabela 1- Compilação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM), por vários autores.....	21
---	----

Manuscrito 1

Table 1 – Combination of sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), amphotericin B (AMB), anidulafungin (ANI), caspofungin (CAS), micafungin (MFG), miconazole (MON), posaconazole (POS), voriconazole (VOR) and terbinafine (TRB) against seven <i>Conidiobolus lamprae</i> strains.....	59
--	----

Manuscrito 2

Tab 1 – Glucan content of <i>Pythium</i> spp. mycelia and β-glucan extract	83
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	5-fluorcitosina
AMB	Anfotericina B
ANI	Anidulafungina
AZI	Azitromicina
CAS	Caspofungina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLA	Claritromicina
CLR	<i>C-type lectin receptors</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMA	<i>Corn Meal Agar</i>
CR3	<i>Complement receptor type 3</i>
CTZ	Cetoconazol
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern molecules</i>
DOX	Doxiciclina
E-ADA	<i>Ecto-adenosine deaminase</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FICI	<i>Fractional inhibitory concentration index</i>
FLZ	Fluconazol
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HE	Hematoxilina-eosina
IK	Iodeto de potássio
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon gama
ITZ	Itraconazol
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MFG	Micafungina
MIN	Minociclina
MON	Miconazol
NK	<i>Natural killer</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POS	Posaconazol
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
SMX-TMP	Sulfametoxazol-trimetoprima
SSIK	Solução saturada de iodeto de potássio
Th	<i>T helper</i>
TIG	Tigeciclina
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TRB	Terbinafina
Treg	<i>Regulatory T cell</i>
VOR	Voriconazol
WB	<i>Western blot</i>

SUMÁRIO

1 Apresentação	13
1.2 Referencial Teórico	16
1.2.1 Conidiobolomicose.....	16
1.2.1.1 Aspectos epidemiológicos	16
1.2.1.2 Manifestações clínicas.....	17
1.2.1.3 Diagnóstico.....	18
1.2.1.4 Tratamento.....	19
1.2.1.5 Suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos	20
1.2.2 Pitiose	22
1.2.2.1 Aspectos epidemiológicos	22
1.2.2.2 Manifestações clínicas.....	23
1.2.2.3 Diagnóstico.....	24
1.2.2.4 Tratamento quimioterápico, cirúrgico e suscetibilidade aos antimicrobianos .	25
1.2.2.5 Imunoterapia.....	27
1.2.2.6 Antígenos imunorreativos de <i>Pythium insidiosum</i>	30
1.2.2.7 Modelos experimentais de pitiose <i>in vivo</i>	31
1.2.3 Parede celular dos fungos	32
1.2.3.1 Parede celular de <i>Pythium insidiosum</i>	34
1.2.3.2 Glucanas fúngicas.....	35
1.2.4 Imunologia das infecções fúngicas.....	38
1.3 Objetivos.....	40
1.3.1 Objetivo Geral	40
1.3.2 Objetivos Específicos	40
1.4 apresentação.....	41
2 Artigo 1 - <i>In vitro</i> susceptibility of <i>Conidiobolus lamprauges</i> recovered from sheep to antifungal agents.....	42

3 Manuscrito 1 - <i>In vitro</i> assessment of antifungal drugs and sulfamethoxazole/trimethoprim against clinical isolates of <i>Conidiobolus lamprauges</i>	47
4 Artigo 2 - A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of <i>Pythium insidiosum</i>	60
5 Manuscrito 2 – Extraction and characterization of a <i>Pythium insidiosum</i> -derived β -glucan and its immunomodulatory activity on lymphocyte proliferation and in mice immunization.....	64
6 Manuscrito 3 – Insights on to the cellular response to <i>Pythium insidiosum</i> zoospores infection in a chemical-induced immunosuppressive murine model of pythiosis.....	88
7 Discussão	107
8 Conclusão	115
Referências	116

1 APRESENTAÇÃO

Até o final da década de 1960, quando Whittaker (1969) criou o reino Fungi, os fungos eram classificados dentro do reino Plantae e pertenciam a três classes: Ficomictos, Ascomictos e Basidiomicetos. A classe dos Ficomictos compreendia uma miscelânea de organismos evolutivamente diferentes e os membros desta classe foram então realocados em diferentes classes: Zygomycetes, Chytridiomycetes, Hypochytridiomycetes, Trychomycetes e Oomycetes.

O termo ficomicose era utilizado para descrever infecções de humanos e animais causadas por fungos das ordens Mucorales (família: Mucoraceae, gêneros: *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*) e Entomophthorales (família: Entomophthoraceae, gêneros: *Basidiobolus*, *Conidiobolus*) da classe Zygomycetes e da ordem Peronosporales (família: Pythiaceae, gênero: *Pythium*) da classe Oomycetes (Miller, 1983a).

As infecções causadas pelos membros da classe Zygomycetes, ordens Mucorales e Entomophthorales também eram referidas como zigomicoses. No entanto, uma nova classificação baseada em estudos filogenéticos moleculares, extinguiu a classe Zygomycetes e distribuiu os fungos anteriormente pertencentes ao filo Zygomycota em cinco táxons: o filo Glomeromycota contendo os fungos micorrízicos arbusculares e os demais zigomicetos foram distribuídos em quatro subfilos, sendo eles, Mucromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina e Entomophthoromycotina, sem ligação à qualquer filo (Hibbett *et al.*, 2007). Recentemente, através de uma análise genética mais aprofundada, Humber (2012) identificou um novo filo, Entomophthoromycota o qual, englobou os fungos pertencentes ao subfilo Entomophthoromycotina. Desta forma, o termo zigomicose, que é utilizado por médicos e micologistas há décadas não se relaciona com a correta taxonomia destes fungos. Uma vez que as infecções causadas pelos organismos pertencentes às duas ordens acima referidas diferem clínica e patologicamente, têm-se utilizado os termos mucormicoses e entomoftoromicoses para as infecções causadas pelos fungos da ordem Mucorales e da ordem Entomophthorales, respectivamente (Ibrahim *et al.*, 2011).

A ordem Entomophthorales inclui dois gêneros histopatologicamente semelhantes, mas clinicamente e micologicamente distintos: *Basidiobolus* e *Conidiobolus*. A basidiobolomicose é a infecção fúngica causada por espécies de *Basidiobolus* e a conidiobolomicose (também conhecida como rinoficomicose, rinoentomoftoromicose ou zigomicose nasofacial) é causada pelas espécies *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruous* e *C. lamprauges* (Ribes *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2010).

Com o aprofundamento dos estudos filogenéticos moleculares também a classe Oomycetes sofreu mudanças taxonômicas, passando a pertencer ao reino Straminipila. As modificações também realocaram o gênero *Pythium* para a ordem Phytales (Alexopoulos *et al.*, 1996). Até 2011, quando Calvano *et al.* (2011) relataram um caso de infecção invasiva causada por *Pythium aphanidermatum*, a espécie *Pythium insidiosum* era considerada a única deste gênero capaz de causar infecções em mamíferos (Gaastra *et al.*, 2010). Embora *P. insidiosum* seja a espécie patógena mais prevalente em mamíferos, progressivamente, *P. aphanidermatum* (Farmer *et al.*, 2015) e outros oomicetos, tais como espécies de *Saprolegnia*, *Aphanomyces* (Phillips *et al.*, 2008) e *Lagenidium* (Mendoza e Vilela, 2013; Vilela *et al.*, 2015a; Mendoza *et al.*, 2016) vêm se destacando como patógenos de humanos e animais. Ressalta-se que o completo sequenciamento do genoma de *P. insidiosum* foi recentemente realizado (Ascunce *et al.*, 2016), o que está propiciando estudos mais aprofundados para completa elucidação evolutiva desta espécie (Tangphatsornruang *et al.*, 2016).

Apesar da reclassificação dos fungos acima mencionados, ainda nos dias de hoje observa-se o uso do termo ficomicose em infecções que se apresentam histologicamente com hifas esparsamente septadas, irregularmente ramificadas e inflamação eosinofílica, piogranulomatosa, características que são compartilhadas pelas infecções causadas por espécies de *Basidiobolus*, *Conidiobolus* e *Pythium* (Mendoza *et al.*, 1996; Grooters, 2003).

Uma vez que a basidiobolomicose, a conidiobolomicose e a pitiose apresentam semelhanças clínicas e compartilham características histopatológicas, o diagnóstico diferencial deve ser o mais rápido possível, pois além dos tratamentos dessas doenças diferirem entre si, o melhor prognóstico (cura clínica) está diretamente associado com o tratamento nos estágios iniciais da doença, o que exige técnicas precisas e rápidas de diagnóstico (Grooters, 2003; Yang *et al.*, 2010). Além de métodos de diagnóstico rápido, seguro e de baixo custo, essas doenças necessitam uma melhor e mais ampla avaliação da suscetibilidade dos patógenos frente aos fármacos utilizados atualmente, bem como a avaliação da associação desses fármacos, uma vez que estas infecções nem sempre respondem satisfatoriamente aos tratamentos e de novas propostas terapêuticas não quimioterápicas.

As infecções causadas por *P. insidiosum* apresentam uma resposta terapêutica insatisfatória aos antifúngicos atualmente disponíveis e as opções terapêuticas comumente utilizadas são a excisão cirúrgica, a administração de fármacos antimicrobianos e de imunoterápicos que apresentam diferentes resultados no tratamento da pitiose (Gaastra *et al.*, 2010). Casos de insucesso terapêutico com antifúngicos também ocorrem com as infecções causadas por espécies de *Conidiobolus* (Yang *et al.*, 2010; Kimura *et al.*, 2011). Além disso, a

espécie *C. lamprauges* foi recentemente relatada como capaz de causar infecção vascular invasiva em humanos e os estudos de suscetibilidade e tratamento das infecções causadas por esta espécie ainda são escassos (Kimura *et al.*, 2011).

Nos casos de pitiose, a imunoterapia desenvolvida a partir de antígenos proteicos de *P. insidiosum* representa uma importante opção terapêutica para o tratamento da pitiose (Moraes *et al.*, 2013), com melhores resultados observados em infecções precocemente diagnosticadas. No entanto, a imunoterapia é curativa e não protetora (Santos *et al.*, 2011). Neste sentido, a busca de opções de vacinas que induzam proteção é desejada. Diversos autores descrevem o potencial de β -glucanas extraídas de fungos com efeito imunomodulatório (Clemons *et al.*, 2014; Clemons *et al.*, 2015), características estas que poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de vacinas protetoras.

Desta forma, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a suscetibilidade de *C. lamprauges*, novas abordagens diagnósticas para *P. insidiosum*, e também, avaliar os aspectos imunológicos da pitiose.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Conidiobolomicose

1.2.1.1 Aspectos epidemiológicos

A conidiobolomicose é uma doença infecciosa causada por espécies do gênero *Conidiobolus*, da ordem Entomophthorales. Três espécies desse gênero são conhecidas por causarem doenças em humanos e animais: *C. coronatus*, *C. incongruus* e *C. lamprauges* (Ribes *et al.*, 2000; Vilela *et al.*, 2010). A espécie mais comumente identificada e a principal patogênica em humanos é a *C. coronatus*, causando tanto infecções localizadas quanto disseminadas (Valle *et al.*, 2001; Chowdhary *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2013; Twizeyimana *et al.*, 2014). *C. incongruus* é responsável por várias infecções invasivas em humanos e animais (Sharma *et al.*, 2003; Madson *et al.*, 2009; Wüppenhorst *et al.*, 2010) e *C. lamprauges* é conhecido por causar infecções principalmente em cavalos (Humber *et al.*, 1989) e ovinos (De Paula *et al.*, 2010; Furlan *et al.*, 2010; Vilela *et al.*, 2010), tendo sido identificado em um caso de infecção disseminada em humano (Kimura *et al.*, 2011).

A incidência da conidiobolomicose é oito vezes maior para o sexo masculino e é mais comum em pessoas que trabalham ao ar livre nas florestas tropicais e subtropicais da África e Sudeste Asiático. O modo de transmissão da conidiobolomicose não foi claramente estabelecido, mas a predileção do organismo por infectar a cabeça e o rosto sugere que a via de inoculação seja por meio da inalação de esporos ou através de traumas menores no nariz ou face, sendo possível também, que a infecção seja transmitida por picada de insetos (Gugnani, 1992). Os agentes etiológicos da conidiobolomicose são comumente encontrados na natureza e já foram isolados de amostras de solo, matéria vegetal em decomposição, insetos, e nos conteúdos gastrointestinais de lagartos e sapos, especialmente em regiões tropical e subtropical (Ribes *et al.*, 2000).

No Brasil, a conidiobolomicose em ovelhas é comum nos Estados do Piauí (Silva *et al.*, 2007b), Paraíba (Riet-Correa *et al.*, 2008) e Mato Grosso (Boabaid *et al.*, 2008), gerando grandes perdas econômicas devido ao alto custo do tratamento dos animais infectados e também à perda de animais devido ao diagnóstico tardio (De Paula *et al.*, 2010). Nos Estados do Rio Grande do Sul (Pedroso *et al.*, 2009) e Santa Catarina (Furlan *et al.*, 2010) a ocorrência nos rebanhos é esporádica.

Em humanos, o primeiro caso de infecção causada por *Conidiobolus* foi relatado na Jamaica (Bras *et al.*, 1965). No Brasil, o primeiro caso registrado ocorreu na região Nordeste, no Estado da Bahia (Andrade *et al.*, 1967) e posteriormente foram registrados outros casos na mesma região, que concentra a maior parte dos relatos (Costa *et al.*, 1991; Valle *et al.*, 2001; Bittencourt *et al.*, 2006), havendo também registro de casos no Pará (região Norte) (Moraes *et al.*, 1994), Mato Grosso (região Centro-oeste) (Tadano *et al.*, 2005) e São Paulo (região Sudeste) (De Castro *et al.*, 1992).

1.2.1.2 Manifestações clínicas

Em humanos a forma mais comum da infecção é a rinofacial crônica, envolvendo a mucosa e o tecido subcutâneo do nariz em hospedeiros saudáveis (Ribes *et al.*, 2000). Esta forma também é conhecida como rinoentomoftoromicose, conidiobolomicose, rinoficomicose ou entomoftoromicose rinoacial (Thakar *et al.*, 2001). A doença começa com uma tumefação na mucosa do turbinado inferior e se espalha para outras partes da cavidade nasal, seios paranasais e tecido subcutâneo do nariz atingindo os lábios. A tumefação é seguida de eritema e espessamento da pele da região nasal, o que leva a uma deformação monstruosa em casos crônicos (Bittencourt *et al.*, 2006). A disseminação da doença é rara, apenas cinco casos de infecção disseminada já foram relatados: dois casos onde o agente era *C. incongruus* (Busapakum *et al.*, 1983; Walsh *et al.*, 1994), um caso por *C. coronatus* (Walker *et al.*, 1992), um caso por *C. lamprauges* (Kimura *et al.*, 2011) e um caso por *Conidiobolus* spp. onde não foi identificada a espécie (Jaffey *et al.*, 1990).

Os casos de doenças em animais abrangem equinos, caninos, ovinos, muares, golfinhos, macacos, lhamas e cervos (Johnston *et al.*, 1967; Roy, 1974; Medway, 1980; French e Ashworth, 1994; Hawkins *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007a; Madson *et al.*, 2009). Em equinos, a rinoentomoftoromicose causa lesões ulcerativas e granulomatosas contendo nódulos, denominados de “kunkers”, na região nasofaríngea (Humber *et al.*, 1989).

A doença em ovinos é caracterizada por lesões granulomatosas e necróticas na região etmoidal e nasofaríngea que se estendem para os ossos turbinados, frequentemente invadindo o cérebro e a órbita. Um sinal clínico muito característico da doença é a exoftalmia e lesões do olho pela extensão do granuloma para o tecido retrobulbar, o que foi observada em 91,6% dos casos (Silva *et al.*, 2007a). A disseminação da doença para o cérebro, pulmões, linfonodos, rins e outros órgãos foi previamente relatada (Carrigan *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2007a; Mackey *et al.*, 2015).

1.2.1.3 Diagnóstico

O exame físico, especialmente em áreas nas quais a infecção é endêmica, é uma característica importante para o diagnóstico das infecções por *Conidiobolus* spp. Quando as características de micoses subcutâneas, particularmente envolvendo o sítio da sinusite, estão presentes, biópsia e cultura dos tecidos subcutâneos e submucosos são necessários para estabelecer o diagnóstico (Ibrahim *et al.*, 2011).

O material de biópsia pode ser cultivado em batata dextrose ágar (BDA) onde *Conidiobolus* spp. apresentam crescimento rápido, 3 a 4 dias entre 30°-35°C, com colônias planas, glabras com pregas radiais e coloração creme. As colônias maduras tornam-se marrons com reverso branco (Reiss *et al.*, 2012). Microscopicamente as hifas são largas (6-15 µm de largura) e mais ou menos septadas, sendo que o grau de septação aumenta com a idade da cultura. O organismo produz conidióforos curtos que não são ramificados e que são difíceis de diferenciar das hifas vegetativas. Os conidióforos (esporangiôforos) produzem um conídio unicelular grande (20-45 µm de diâmetro) (Ribes *et al.*, 2000).

Para avaliação histopatológica, prefere-se o uso do corante hematoxilina-eosina (HE) porque ressalta o fenômeno Splendore-Hoepli, no qual as hifas, que são largas, de paredes finas, raramente ramificadas e ocasionalmente septadas, são visualizadas por estarem rodeadas por eosinófilos (Reiss *et al.*, 2012). Observa-se uma reação inflamatória granulomatosa que penetra a derme e o tecido subcutâneo. O infiltrado mononuclear predominante consiste de linfócitos, macrófagos e células multinucleadas gigantes, alguns contendo elementos fúngicos. Além disso, estão presentes células plasmáticas e diversos eosinófilos (Reiss *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que nem todas as infecções por *Conidiobolus* spp. apresentam o fenômeno de Splendore-Hoepli e que ele também é encontrado em casos de basidiobolomicose e pitiose (Ribes *et al.*, 2000; Tabosa *et al.*, 2004). Embora *Conidiobolus* spp. e *Pythium insidiosum* possam ser associados com rinofaringite ou rinite rinofacial em ovinos, a localização e frequência de lesões macroscópicas fornece uma base conveniente para o diagnóstico. As lesões de conidiobolomicose em ovinos são, muitas vezes, rinofaríngeas e aparecem como uma massa amarela ou branca e firme, em contraste com a pitiose, que tem uma predileção pela região rinofacial e produz lesões caracterizadas pela presença de tecido necrosado e friável (Ubiali *et al.*, 2013).

Testes sorológicos para a detecção de *Conidiobolus* spp. foram anteriormente descritos (Miller e Campbell, 1982; Yangco *et al.*, 1986; Kaufman *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2015), mas não estão disponíveis comercialmente (Reiss *et al.*, 2012). O diagnóstico definitivo da doença

pode ser obtido através de técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* ou PCR) (De Paula *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2013).

Em geral a infecção apresenta grande dificuldade diagnóstica, por não ser suspeitada em sua fase inicial. Assim, a maior parte dos casos é diagnosticada nos estágios avançados da doença. O atraso no diagnóstico, e consequente maior extensão da lesão, tornam o tratamento mais difícil, em função da baixa resposta terapêutica.

1.2.1.4 Tratamento

Até o momento, nenhum fármaco administrado isoladamente demonstrou ser eficiente para o tratamento de todos os casos de entomoftoromicose. Em humanos, têm-se utilizado durante as infecções as soluções saturadas de iodeto de potássio (SSIK), sulfametoxazol-trimetoprima (SMZ-TMP), anfotericina B (AmB), antifúngicos azólicos e uma combinação desses agentes, com sucesso terapêutico variado (Ibrahim *et al.*, 2011).

Devido ao baixo custo, as SSIK têm sido administradas oralmente por um período de quatro semanas a um ano ou mais. Determinar o tempo de tratamento torna-se difícil devido as diferentes respostas clínicas observadas nos pacientes tratados. Além disso, as recorrências são comuns e ocorrem pela baixa adesão a rotina diária de tratamento, intolerância ao iodeto de potássio e abandono precoce do tratamento (Reiss *et al.*, 2012). O uso de SMZ-TMP apresenta menos efeitos colaterais que as SSIK, porém deve ser administrado em altas doses por um longo período de tempo (Restrepo, 1994). A AmB não é o fármaco de escolha como terapia primária, mas é utilizado como terapia de salvação (Ibrahim *et al.*, 2011).

Em humanos, respostas clínicas foram observadas com o uso oral dos azólicos: itraconazol (ITZ) (200-400 mg/dia), cetoconazol (CTZ) (200 – 600 mg/dia) durante 3 a 4 meses, fluconazol (FLZ) (100 – 200 mg/dia) (Reiss *et al.*, 2012). Um caso de infecção avançada que respondeu apenas parcialmente ao tratamento com ITZ apresentou, com mais dois meses de uso de voriconazol (VOR), cura clínica e micológica sem recidiva em dois anos de acompanhamento (Moore *et al.*, 2007). O uso de terbinafina (TRB) combinada com AmB ou ITZ também se mostrou útil (Foss *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 2008; Cherian *et al.*, 2015).

A combinação de antifúngicos azólicos com SSIK produziu efeitos duradouros quando não houve uma resposta adequada à terapia com SSIK sozinho (Thakar *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2006) e curativos (ITZ + SSIK) (Gupta *et al.*, 2016). As recaídas são comuns, de modo que o tratamento deve ser continuado por um mês ou mais após a remissão dos sintomas. A ressecção cirúrgica não é por si só curativa, mas tem valor depois de uma resposta clínica ao

tratamento antifúngico, no debridamento das lesões e na cirurgia reconstrutiva após cura clínica e micológica (Reiss *et al.*, 2012). Com relação ao tratamento de infecções em animais, um caso de infecção pulmonar por *Conidiobolus* spp em canino foi relatado por obter sucesso terapêutico com o uso de ITZ (Hawkins *et al.*, 2006).

1.2.1.5 Suscetibilidade in vitro aos antimicrobianos

Yangco *et al.* (1984) testaram a suscetibilidade de três cepas isoladas de infecções em humanos (duas *C. coronatus* e uma *C. incongruus*) contra AmB, miconazol (MON), CTZ, 5-fluorocitosina (5-FC) e iodeto de potássio (IK). Os autores observaram as seguintes concentrações inibitórias mínimas (CIMs): AmB, 0,098-0,39 µg/mL; MON, 0,098-3,1 µg/mL; CET, 0,195-1,56 µg/mL; 5-FC, 200 µg/mL e IK, ≥ 30.000 µg/mL, demonstrando a resistência das cepas testadas apenas ao 5-FC e IK.

Um isolado de *C. incongruus* oriundo de um paciente com entomoftoromicose disseminada foi avaliado através da técnica de macrodiluição em caldo. As CIMs encontradas mostraram resistência à AmB (>18,5 µg/mL), 5-FC (>322 µg/mL) e FLZ (>80 µg/mL) e a associação entre AmB e 5-FC não mostrou interação sinérgica ou aditiva (FICI ≥ 2) (Walsh *et al.*, 1994). A avaliação da suscetibilidade de outra cepa de *C. incongruus* também oriunda de infecção em humano, mostrou CIMs de 4 µg/mL (24 h) e 8 µg/mL (48 h) para AmB, 16 µg/mL (24 h) e >16 µg/mL (48 h) para CTZ, 1 µg/mL (24 h) e 8 µg/mL (48 h) para ITZ e >64 µg/mL (24 h) para 5-FC (Temple *et al.*, 2001).

Em outro estudo de suscetibilidade *in vitro* Guarro *et al.* (1999) avaliaram seis cepas de *C. coronatus*, uma cepa de *C. incongruus* e uma de *C. lamparuges* pelo método de microdiluição em caldo contra ITZ, CTZ, FLZ, 5-FC e AmB e observaram uma baixa suscetibilidade, próxima à resistência. As CIMs encontradas nesse estudo mostram uma variabilidade entre os isolados com AmB e *C. coronatus*, onde, quatro isolados mostraram CIM de 4 µg/mL, um com CIM de 2 µg/mL e outro com CIM de 0,5 µg/mL; *C. incongruus* com CIM de 4 µg/mL e *C. lamparuges* com CIM de 8 µg/mL. Para o FLZ as CIMs foram de 128 µg/mL (sete cepas) e 32 µg/mL para *C. lamparuges*. As CIMs do CTZ foram 32 µg/mL (sete cepas) e 8 µg/mL para *C. lamparuges*. 5-FC com CIMs de 256 µg/mL (sete cepas) e 128 µg/mL para uma cepa de *C. coronatus*. ITZ com CIMs variando de 32 µg/mL (seis cepas) a 0,5 e 1,0 µg/mL para duas cepas de *C. coronatus*.

Teste de suscetibilidade *in vitro* também foi realizado com uma cepa de *Conidiobolus* sp. oriunda de uma infecção pulmonar em canino, para a qual não foi possível identificar a

espécie. O micro-organismo apresentou CIMs de 2 µg/mL (24 h) e 4 µg/mL (48 h) para AmB e demonstrou ser resistente ao FLZ (64 µg/mL) e ITZ (8 µg/mL) (Hawkins *et al.*, 2006).

Em um relato de caso de entomoftomicose por *C. coronatus*, realizou-se um teste de suscetibilidade seguindo os protocolos do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2 e as CIMs encontradas foram: IK - 21750 µg/mL; FLZ 0,5 µg/mL e VOR 0,125 µg/mL (Bento *et al.*, 2010).

Wüppenhorst *et al.* (2010) realizaram teste de suscetibilidade *in vitro*, utilizando o método de Etest, para um isolado de *C. incongruus* oriundo de um caso de entomoftoromicose rino-orbital em humano e encontraram as seguintes CIMs: 1 µg/mL para SMZ-TMP, ≥ 32 µg/mL para VOR, posaconazol (POS), AmB e caspofungina (CAS) e ≥ 256 µg/mL para FLZ.

Tabela 1- Compilação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM), por vários autores.

Antimicrobiano	<i>C. coronatus</i>	<i>C. incongruus</i>	<i>C. lampragues</i>	CLSI M38-A2 ^a
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Anfotericina B	0,5 - 4 (2,51)	4 - >32 (14,23)	8 (8)	0,5-2,0 (>2,0 FT)
Flucitosina	128 - 256 (228)	> 256	256 (256)	> 64 (R)
Iodeto de potássio	21.750	-	-	
Fluconazol	0,5 (0,5)	> 64	32 - 128 (107)	> 64 (R)
Cetoconazol	32 (32)	> 32	8 (8)	0,03 -16*
Itraconazol	-	8 - 32 (16)	1 - 32 (5,65)	0,03 -16 (>8-R)
Voriconazol	0,125	> 32	> 16	0,03 -16*
Posaconazol	-	>32	4	0,03 -16*
Sulfametoxazol + trimetoprima	-	1	-	
Caspofungina	-	>32	> 8	≤ 1*
Anidulafungina	-	-	>8	≤ 1*
Micafungina	-	-	>8	≤ 1*
Miconazol	-	-	1	
Terbinafina	-	-	0,125	≤ 0,25 *

^a, *Breakpoints* sugerindo resistência (R) ou CIM comumente observada na ausência de descrição de resistência; * sem correlação entre as CIM e os resultados clínicos; FT, falha terapêutica; R, resistência. Os valores compilados (Yangco *et al.*, 1984; Guarro *et al.*, 1999; Temple *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 2006; Bento *et al.*, 2010; Wüppenhorst *et al.*, 2010; Kimura *et al.*, 2011) representam a variação das CIMs (média geométrica).

Uma cepa de *C. lampragues*, recuperada do primeiro caso de infecção em humanos por esta espécie, também foi submetida a testes de suscetibilidade seguindo o protocolo CLSI M38-A2. Os resultados obtidos em 24 e 48 horas foram: AmB, 4 e 8 µg/mL; anidulafungina (ANI) >8 µg/mL; CAS, >8 µg/mL; micafungina (MFG), >8 µg/mL; ITZ, 0,5 e 1 µg/mL; POSA, 4 e 4

$\mu\text{g/mL}$; VOR, $>16 \mu\text{g/mL}$; MON, 0.25 e $1 \mu\text{g/mL}$; TRB, 0.03 e $0.125 \mu\text{g/mL}$. Estudo de sinergismo entre ITZ e TRB e entre POS e TRB resultou em indiferença (Kimura *et al.*, 2011).

A tabela 1 representa uma compilação das CIMs descritas por vários autores.

1.2.2 Pitiose

1.2.2.1 Aspectos epidemiológicos

Pythium insidiosum é o agente etiológico da pitiose humana e animal. Os casos de pitiose são descritos em regiões de clima tropical e subtropical e tem maior prevalência na Austrália, Ásia e América Latina. No entanto, alguns casos são procedentes de áreas temperadas do Japão, Coréia do Sul e Estados Unidos, alguns países europeus, África e Oceania (Mendoza, 2009; Mendoza e Vilela, 2009; Gaastra *et al.*, 2010).

O primeiro relato de pitiose do Brasil foi descrito em equinos e relatado no Rio Grande do Sul por Santos e Londero (1974) e atualmente, baseado em publicações científicas e pesquisa documental sobre a venda do imunoterápico PitiumVac®, pode-se inferir que casos da doença já ocorram em todas as regiões do Brasil, sendo a região do Pantanal brasileiro considerada como o local de maior incidência e prevalência de pitiose equina do mundo (Santurio e Ferreiro, 2008; Carrera *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2015), onde taxas de prevalência de 5%, mortalidade e letalidade de 1,3% e 23,1%, respectivamente, foram observadas (Dos Santos *et al.*, 2014).

Os trabalhos retrospectivos apontam uma soroprevalência de pitiose em 11% do equinos no Rio Grande do Sul (Weiblen *et al.*, 2016), sendo que a pitiose equina representa aproximadamente 25% das infecções cutâneas da região semiárida do Brasil (Pessoa *et al.*, 2014) e 76% dentre as infecções causadas por fungos/oomicetos no Sul do Brasil (Marcolongo-Pereira *et al.*, 2014). Na região central (RS), 22% das micoses/oomicozes de animais domésticos (Galiza *et al.*, 2014) foram relatados como casos de pitiose.

O ciclo biológico do *P. insidiosum* está associado com o crescimento microbiano deste micro-organismo em áreas pantanosas, 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, 1983b). Embora nos últimos anos alguns autores venham descrevendo a recuperação ambiental de *P. insidiosum* de ambientes aquáticos (Presser e Goss, 2015) e mesmo do solo (Vanittanakom *et al.*, 2014), determinou-se

em laboratório que as hifas de *P. insidiosum* não apresentam características (força) de invasão suficiente para penetrar na pele saudável intacta, o que sugere que lesões macro ou microscópicas são necessárias para a infecção iniciar nos hospedeiros (Ravishankar *et al.*, 2001; Macdonald *et al.*, 2002).

Neste contexto, os casos de pitiose em humanos e outros mamíferos estão associados com o contato do hospedeiro com áreas onde ocorre acúmulo de água (banhados e lagos), presença de zoósporos e/ou *kunkers* (Fonseca *et al.*, 2014) e temperatura ambiental entre 30 e 40°C (Gaastra *et al.*, 2010). Maior frequência de pitiose animal é descrita em equinos que habitam áreas pantanosas e, em humanos, em pacientes talassêmicos tailandeses, onde é comum o trabalho em áreas alagadas de cultivo do arroz. A transmissão entre os animais e entre animais e humanos não foi descrita (Krajaejun *et al.*, 2006b; Pupaibool *et al.*, 2006; Gaastra *et al.*, 2010).

1.2.2.2 Manifestações clínicas

As lesões ulcerativas e piogranulomatosas que podem ser superficiais (cutâneas e subcutâneas) ou profundas (viscerais) são as manifestações clínicas mais observadas em equídeos (Poole e Brashier, 2003; Gaastra *et al.*, 2010; Pessoa *et al.*, 2014), os quais são os animais mais afetados por esta doença. A pitiose nas formas cutânea, subcutânea e gástrica também é descrita em caninos (Dykstra *et al.*, 1999; Oldenhoff *et al.*, 2014; Fujimori *et al.*, 2016), existindo também casos relatados de pitiose cutânea em bovinos (Santurio *et al.*, 1998; Thomas e Lewis, 1998), felinos (Thomas e Lewis, 1998), pitiose cutânea e rinite em ovinos e caprinos (Tabosa *et al.*, 2004; Santurio *et al.*, 2008; Ubiali *et al.*, 2013; Bernardo *et al.*, 2015; Do Carmo *et al.*, 2015) e esporadicamente acometimento cutâneo e subcutâneo de animais mantidos em cativeiro em zoológicos (Grooters, 2003; Camus *et al.*, 2004; Wellehan *et al.*, 2004) e pássaros (Pesavento *et al.*, 2008).

As lesões nos equídeos ocorrem nas áreas anatômicas de maior contato com as águas contaminadas, tais como extremidades distais dos membros, porção ventral (abdômen) e face. As lesões têm aspecto tumoral com a observação de ulcerações, granulomas e secreção mucossanguíolenta contínua. Em caninos e felinos, a forma gastrointestinal está associada com a ingestão de água contaminada com zoósporos e manifesta-se como distúrbios digestivos (vômito, anorexia e diarreia). Nos casos menos frequentes de pitiose, como em bovinos, lesões cutâneas granulomatosas são observadas nas extremidades distais dos membros, já em ovinos as infecções da região nasal estão associadas com a pastagem de vegetação aquática em áreas

contaminadas com zoósporos de *P. insidiosum* (Gabriel *et al.*, 2008; Santurio e Ferreiro, 2008; Grecco *et al.*, 2009; Bernardo *et al.*, 2015).

Nos seres humanos a pitiose pode apresentar-se como infecções superficiais: ceratite com envolvimento da córnea (Virgile *et al.*, 1993; Murdoch e Parr, 1997; Badenoch *et al.*, 2001; Thanathanee *et al.*, 2013); 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.*, 2006b; Reanpang *et al.*, 2015). Apesar da pitiose acometer indivíduos aparentemente saudáveis (Triscott *et al.*, 1993; Thianprasit *et al.*, 1996; Lelievre *et al.*, 2015), 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). No entanto, a pitiose em humanos já foi descrita em outras condições de imunossupressão como leucemia e Doença de Crohn, em outras partes do mundo (Heath *et al.*, 2002; Hung e Leddin, 2014).

1.2.2.3 Diagnóstico

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).

Ao exame direto com KOH 10%, realizado geralmente de raspados ou swabs de casos de ceratite, tecidos (biópsia) ou *kunkers*, o micro-organismo é observado como hifas hialinas e eventualmente septadas, morfologia que facilmente pode ser confundida com a maioria dos fungos filamentosos (Mendoza e Vilela, 2009). A cultura microbiológica destes materiais clínicos em ágar V8, ágar farinha de milho (CMA) ou ágar Sabouraud dextrose permite a recuperação deste micro-organismos entre 24 e 48h após incubação a 37°C. As colônias apresentam coloração branca ou hialina (Grooters *et al.*, 2002). Testes bioquímicos e enzimáticos (Zanette *et al.*, 2013c; Vilela *et al.*, 2015b) foram descritos na tentativa de evidenciar um perfil metabólico específico de *P. insidiosum*, mas não são utilizados na rotina micológica para a identificação desta espécie.

Na análise histopatológica, observa-se tecido fibrótico com múltiplas, muitas vezes coalescentes, áreas de tecido de granulação circundando de núcleos eosinofílicos. O número de hifas intralesionais, sua distribuição, a presença de invasão dos vasos e a natureza das reações

inflamatórias locais podem variar de acordo com o hospedeiro e o tecido acometido (Martins *et al.*, 2012). A deposição de material amorfó, eosinofílico e hialino ao redor das hifas de *P. insidiosum* (Fenômeno de Splendore-Hoeppli), também é observado em outras infecções fúngicas, como nas entomoftoromicoses. Desta forma, técnicas de imuno-histoquímica utilizando soro hiperimune produzidos em coelhos, são grande valia para o diagnóstico definitivo da pitiose (Gabriel *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2012; Doria *et al.*, 2014). Recentemente, uma técnica de imuno-histoquímica utilizando a proteína elicitina ELI025, identificada em *P. insidiosum*, mas não em outros patógenos humanos, incluindo fungos (Lerksuthirat *et al.*, 2015a; Lerksuthirat *et al.*, 2015b), demonstrou 100% de especificidade (Inkomlue *et al.*, 2016).

O diagnóstico da pitiose também pode ser realizado através de testes sorológicos para a detecção de anticorpos. Entre eles, a imunodifusão em gel de ágar (Mendoza *et al.*, 1996), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Mendoza *et al.*, 1997; Krajaejun *et al.*, 2002; Keeratijarut *et al.*, 2013), *Western blot* (WB), aglutinação em látex (Mendoza e Vilela, 2009) e testes imunocromatográficos (ICT) (Krajaejun *et al.*, 2009). Os testes de ELISA e ICT demonstram ótima performance diagnóstica (100% de especificidade e sensibilidade), enquanto que a imunodifusão apresenta uma sensibilidade menor (68%) (Chareonsirisuthigul *et al.*, 2013).

Sugere-se, no entanto, que a identificação definitiva desta espécie deva ser realizada com o uso de metodologias moleculares (Grooters e Gee, 2002; Schurko *et al.*, 2004; Vanittanakom *et al.*, 2004). Vários métodos utilizando técnicas de PCR, PCR em tempo real, Nested PCR para a detecção de regiões moleculares específicas e características deste micro-organismo, como a detecção do gene exo-1,3-β-glucanase ou sequenciamento do DNA, foram descritos para a identificação precisa de *P. insidiosum* a partir de cultura e amostras clínicas (Botton *et al.*, 2011; Salipante *et al.*, 2012; Thongsri *et al.*, 2013; Keeratijarut *et al.*, 2014; Kosrirukvongs *et al.*, 2014; Keeratijarut *et al.*, 2015a; Keeratijarut *et al.*, 2015b).

1.2.2.4 Tratamento quimioterápico, cirúrgico e suscetibilidade aos antimicrobianos

P. insidiosum é muitas vezes descrito como um pseudo-fungo devido a sua morfologia miceliana. Esta característica naturalmente induziu os primeiros tratamentos de casos de pitiose com fármacos 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.*, 2006b). Considerando que os principais fármacos antifúngicos agem direta ou

indiretamente sobre o ergosterol e que *P. insidiosum* não tem vias de síntese de ergosterol (Schlosser e Gottlieb, 1966), é compreensível que a maioria dos casos de pitiose não respondam satisfatoriamente ao tratamento com antifúngicos.

Desta forma, devido à agressividade da doença, na maioria dos casos a terapia com antifúngicos é ineficaz e a remoção cirúrgica da lesão, amputação do membro afetado ou enucleação do olho afetado representam o último recurso no tratamento da pitiose em humanos (Barequet *et al.*, 2013; Hahtapornsawan *et al.*, 2014; Permpalung *et al.*, 2015) e em animais (Dycus *et al.*, 2015). No entanto, taxas de recorrência de 40% já foram descritas, 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, perfusão regional com anfotericina B+dimetilsulfóxido e antifúngicos+imunoterapia são descritas em casos de cura terapêutica. Terapias satisfatórias para cães ainda são consensuais e o tratamento de equinos com antifúngicos mostra-se economicamente inviável (Santurio e Ferreiro, 2008; Schmiedt *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; Doria *et al.*, 2015).

Os testes de suscetibilidade *in vitro* demonstram que os isolados de *P. insidiosum* apresentam suscetibilidade variável à CAS (Pereira *et al.*, 2007), VOR, ITZ e TRB (Argenta *et al.*, 2008), entre outros. As avaliações da associação de fármacos antifúngicos *in vitro* demonstraram sinergismo na associação de AmB+TRB (Cavalheiro *et al.*, 2009b), TRB+antifúngicos azólicos e TRB+CAS (Cavalheiro *et al.*, 2009a).

Loreto *et al.* (2011) e Mahl *et al.* (2012) descreveram que o crescimento miceliano de *P. insidiosum* é inibido *in vitro* por antibacterianos das classes das tetraciclínas, dos macrolídeos e das glicilciclínas. As menores CIMs foram observadas com a Minociclina (MIN) (0,125-2 µg/mL), doxiciclina (DOX) (0,5-8 µg/mL), azitromicina (AZI) (2-32 µg/mL), claritromicina (CLA) (0,5-8 µg/mL) e tigeciclina (TIG) (0,25-2 µg/mL). Trabalhos subsequentes demonstraram que, além dos antibacterianos citados, outros antibacterianos que inibem a síntese proteica também apresentam grau variado de atividade antimicrobiana *in vitro* contra *P. insidiosum* (Loreto *et al.*, 2014) e podem produzir interações sinérgicas com fármacos antifúngicos (Jesus *et al.*, 2014). Recentemente Jesus *et al.* (2016) avaliaram o potencial terapêutico destes antibacterianos em modelo experimental de pitiose em coelhos e observaram casos de cura clínica em animais tratados com minociclina e/ou azitromicina, o que torna essas classes de antibacterianos bons candidatos para o tratamento da pitiose.

Nos últimos anos, diversos autores descreveram a avaliação antimicrobiana de compostos alternativos aos antifúngicos para a inibição do crescimento de *P. insidiosum*. Loreto

et al. (2012) descreveram a atividade antimicrobiana do disseleneto de difenila *in vitro* e *in vivo* em modelo experimental de pitiose. A suscetibilidade *in vitro* de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae foi descrita por Fonseca *et al.* (2015b) e outras opções como o extrato de alho (Zanette *et al.*, 2011), componentes de *Clausena harmandiana* (Sriphana *et al.*, 2013b), lignanas de *Alyxia schlechteri* (Sriphana *et al.*, 2013a), antimicrobianos voláteis de *Muscodor crispans* (Krajaejun *et al.*, 2012), associação *in vivo* de *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* com a imunoterapia (Fonseca *et al.*, 2015a), dicetopiperazina e pirrolnitrina (metabólitos de *Pseudomonas stutzeri*) (Thongsri *et al.*, 2014) e a terapia fotodinâmica (Pires *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2014) são propostas de terapia alternativas. No entanto, não há dados suficientes que permitam o uso destes compostos em infecções naturalmente adquiridas.

Outra opção de abordagem terapêutica associa-se com a avidez deste microrganismo pelo ferro. É descrito que espécies de *Pythium* competem no ambiente pelo ferro disponível e que a presença de outros micro-organismos produtores de sideróforos podem inibir o crescimento de *Pythium* spp. (Buysens *et al.*, 1996). Clinicamente, o uso de fármacos quelantes de ferro estão associados com o controle de casos de mucormicose (Ibrahim *et al.*, 2006; Spellberg *et al.*, 2012). Neste contexto, Zanette e colaboradores descreveram, em uma série de estudos, a influência do ferro no metabolismo do *P. insidiosum* e também descreveram a atividade *in vitro* e *in vivo* em modelos experimentais de pitiose, do quelante deferasirox, sozinho ou associado com micafungina sobre *P. insidiosum* (Zanette *et al.*, 2013a; Zanette *et al.*, 2013b; Zanette *et al.*, 2015a; Zanette *et al.*, 2015b). Estes estudos indicam o potencial da terapia com fármacos quelantes de ferro no tratamento da pitiose e instigam a expansão de pesquisas nesta área.

1.2.2.5 Imunoterapia

Diferentes formas de preparo das formulações imunoterápicas para o tratamento da pitiose já foram descritas. O primeiro imunoterápico foi testado por Miller (1981) em equinos com pitiose e consistia de micélio inativado submetido à desintegração por ultrassom, utilizado na dose de 5 mg de micélio seco/mL e obtendo índice de 52,5% de cura. Mendoza *et al.* (1992b) testaram dois tipos de imunoterápicos, um feito a partir da massa miceliana inativada, desintegrada pelo uso de homogeneizador automático e utilizado na dose de 5 mg de micélio seco/mL. O outro imunoterápico consistia de antígenos precipitados do caldo de cultivo concentrado e sem a presença de hifas com dose ajustada para 2 mg de proteína/mL. Ambos foram eficazes em curar os animais, sendo que a melhor resposta estava relacionada ao tempo

de início da lesão, lesões com mais de 2 meses não foram curadas por nenhum dos imunoterápicos testados. A análise da estabilidade dos抗ígenos testados mostrou que o oriundo do caldo de cultivo se mantinha ativo por até 18 meses quando mantido a 4°C, tornando-o a melhor opção de uso.

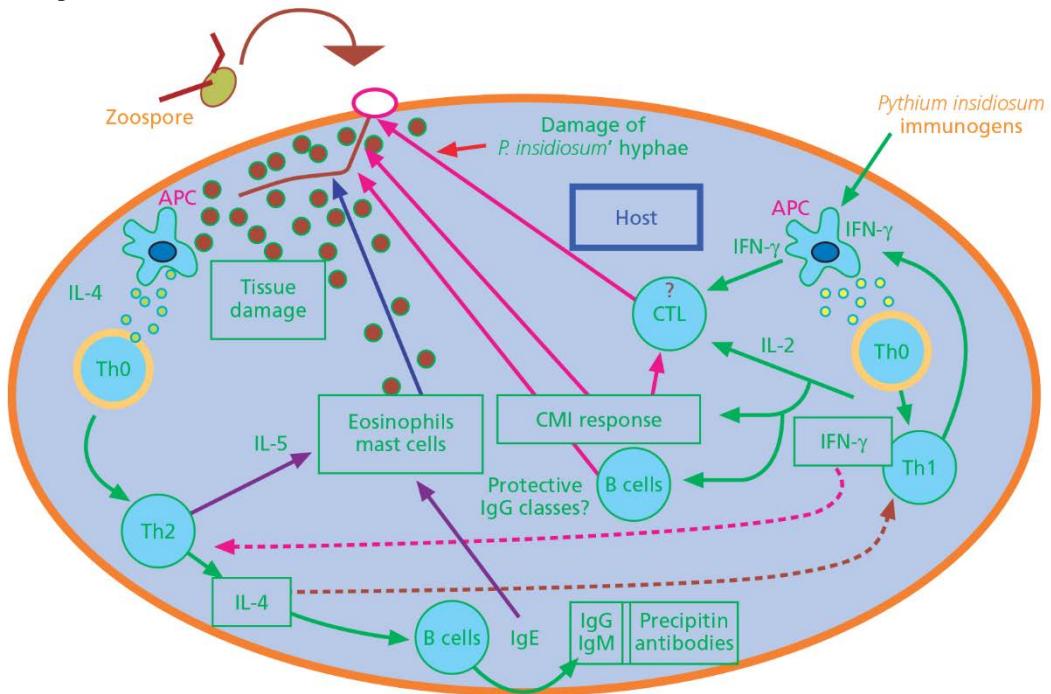
Uma modificação no preparo do imunoterápico foi proposta por Dixon *et al.* (1998), que após sonicar a massa miceliana do *P. insidiosum* coletou o sobrenadante desse processo que continha os抗ígenos extraídos do micélio e adicionou ao caldo de cultivo (exoantígenos liberados durante o crescimento fúngico) previamente separado do micélio. Esta modificação levou a uma resposta de cura em alguns casos de pitiose crônica, o que não ocorria com o uso do imunoterápico testado por Mendoza *et al.* (1992b). Esse novo imunoterápico foi utilizado por Thitithanyanont *et al.* (1998) em um caso de infecção vascular por *P. insidiosum* em um garoto tailândes que não respondeu ao tratamento cirúrgico e farmacológico. Foram aplicadas duas doses do imunoterápico num intervalo de duas semanas, obtendo-se a cura clínica dentro de um ano. Mendoza *et al.* (2003) também testaram esse novo método de preparo do imunoterápico e obtiveram cura de 72% dos equinos testados, inclusive os casos crônicos e 33% de cura para os caninos avaliados.

Um estudo de Santurio *et al.* (2003) avaliou três diferentes preparamos de imunoterápicos de *P. insidiosum*, testando-os em modelo experimental de pitiose em coelhos. Os imunoterápicos foram preparados a partir do micélio que foi submetido à desintegração através do uso de sonicador e de homogeneizador, sendo o terceiro, uma mistura de partes iguais dos dois anteriores. Após serem liofilizados, os imunoterápicos foram administrados aos coelhos com pitiose e a melhor resposta foi obtida com o preparado por homogeneização. A inovação desse estudo foi o procedimento de liofilização do material, que conferiu uma validade superior a um ano sem a necessidade da manutenção em refrigeração, o que era necessário nos imunoterápicos descritos anteriormente.

Na região do Pantanal brasileiro, o teste de eficiência de um imunoterápico para o tratamento da pitiose equina, produzido a partir de culturas de *P. insidiosum*, baseando-se na metodologia anteriormente descrita por Miller (1981), demonstrou índice de cura de 50% a 83,3% entre os grupos tratados (Monteiro, 1999). Esse estudo originou a produção do imunoterápico PitiumVac®, lançado em 1999 e produzido pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Pantanal), já tendo sido utilizado em equídeos de várias raças em 25 estados brasileiros (Moraes *et al.*, 2013).

A imunoterapia apresenta melhores resultados quando a doença se encontra nos estágios iniciais (Mendoza e Newton, 2005; Santurio e Ferreiro, 2008). Propõe-se que sucesso terapêutico da imunoterapia esteja baseado na mudança da resposta celular. A resposta celular observada na pitiose envolve inflamação eosinofílica e expressão de linfócitos T helper Th2, com liberação de interleucinas IL-4 e IL-5, mobilização de eosinófilos e mastócitos. Os抗ígenos do imunoterápico estariam associados com a produção e expressão de linfócitos T helper Th1, produção de IL-2 e interferon- γ , com mobilização de linfócitos T e macrófagos que destroem as células de *P. insidiosum* (Mendoza e Newton, 2005), como demonstrado na Figura 1. Em estudo de Bach *et al.* (2013) foi observado o aumento dos níveis da atividade da enzima ecto-adenosina desaminase (E-ADA) nos linfócitos de coelhos experimentalmente infectados e submetidos à imunoterapia com PitiumVac® o que favoreceria a mudança da resposta Th2 para Th1, corroborando a hipótese anteriormente formulada por Mendoza e Newton (2005). No entanto, dados sobre a resposta clínica a esta imunoterapia demonstram uma característica curativa não gerando uma resposta protetora do hospedeiro às reinfecções (Santos *et al.*, 2011).

Figura 1 - Proposta do mecanismo patogênico envolvido durante a infecção natural e mecanismo induzido pela imunoterapia.



Fonte: Mendoza (2005).

1.2.2.6 Antígenos imunorreativos de *Pythium insidiosum*

Os imunoterápicos apresentam propriedades curativas e são utilizados na presença de sinais clínicos da infecção. A composição desses imunoterápicos não foi totalmente avaliada, sendo apenas referido o conteúdo de proteínas em alguns estudos. As propriedades profiláticas também não foram completamente avaliadas, mas acredita-se que a identificação de proteínas imunodominantes expressas por *P. insidiosum* poderia auxiliar na eficácia dos imunoterápicos já disponíveis ou estimular o desenvolvimento de vacinas profiláticas.

Mendoza *et al.* (1992a) avaliaram antígenos proteicos preparados de cinco cepas de *P. insidiosum* contra seis soros provenientes de equinos com pitiose e observaram a presença de pelo menos vinte antígenos, sendo três deles considerados imunodominantes 28, 30 e 32 kDa. Em estudo que avaliou a massa molecular dos antígenos que reagiram com os anticorpos IgG presentes em uma amostra de soro de humano com pitiose, observaram-se várias bandas imunorreativas: 23, 26, 26, 30, 35, 42, 56, 73 e 110 kDa, sendo que os antígenos de 42 e 35 kDa apresentaram forte reatividade (Vanittanakom *et al.*, 2004). A avaliação de soros provenientes de bovinos infectados mostrou a presença de antígenos imunodominantes de alto peso molecular, variando de 51 a 203 kDa e de baixo peso molecular apenas bandas de 30 e 32 kDa (Perez *et al.*, 2005).

Outro estudo avaliou soros de equinos e bovinos naturalmente infectados, de coelhos imunizados com extrato antigênico de *P. insidiosum* e de equinos tratados com imunoterápico, onde se observou o mesmo padrão de polipeptídeos (33.5, 38, 39, 40 e 80 kDa) para os soros dos equinos e coelhos, já o soro dos bovinos reagiu com quatro polipeptídeos, sendo dois iguais (39 e 40 kDa) e dois diferentes aos encontrados para os outros animais (35 e 70 kDa) (Leal *et al.*, 2005). Krajaejun *et al.* (2006a) utilizando soros de casos de pitiose em humanos, identificaram entre outros, um antígeno com massa molecular de 74 kDa como sendo altamente específico e sensível para a identificação da pitiose em humanos, sugerindo seu uso para o desenvolvimento de um teste de sorodiagnóstico rápido e para melhorar a eficácia da imunoterapia anti-*P. insidiosum*.

Estudo realizado com cepas de *P. insidiosum* recuperados de ambiente aquático mostrou uma banda de 40-35 kDa como um epítopo dominante para as cepas avaliadas (Supabandhu *et al.*, 2008). Chindamporn *et al.* (2009) demonstraram que existe uma variação no perfil de expressão de antígenos das cepas que diferem geograficamente, mas destacam a necessidade da padronização tanto do preparo das frações antigênicas quanto do método a ser utilizado para

a adequada caracterização do perfil imunogênico de *P. insidiosum*. Além disso, chamam a atenção para a necessidade da caracterização molecular dessas proteínas imunogênicas para o melhor entendimento das propriedades imunológicas e imunoterapêuticas desses抗ígenos.

Em estudo recente, Krajaejun *et al.* (2014) identificaram através da análise do transcriptoma de *P. insidiosum* uma série de fatores de virulência, incluindo possíveis efetores e dentre eles, aproximadamente 300 proteínas com o domínio elicita. Efetores são proteínas secretadas pelo patógeno que alteram a resposta de defesa do hospedeiro e facilitam a progressão da infecção (Wawra *et al.*, 2012). Muitas das elicinas presentes em *P. insidiosum* são previstas de serem secretadas (presença de um peptídeo sinalizador) ou de fazerem parte da parede celular (presença de sítio de glicosilação ou glicosilfosfatidilinositol) (Jiang *et al.*, 2006), o que as torna boas candidatas como marcador específico para diagnóstico ou como candidatas ao desenvolvimento de moléculas anti-oomiceto, por exemplo, anticorpos, vacinas e medicamentos (Krajaejun *et al.*, 2014).

1.2.2.7 Modelos experimentais de pitiose in vivo

Os modelos animais são importantes para o estudo da patogênese, virulência, imunologia, diagnóstico e tratamento das infecções fúngicas. Várias espécies de animais têm sido utilizadas em investigações micológicas, mas os ratos e os camundongos são os principais animais utilizados como modelos experimentais (Zak e Sande, 1999; Capilla *et al.*, 2007; Kirkpatrick *et al.*, 2012). No entanto, a maioria dos animais para experimentação animal, e mesmos os equinos, são considerados refratários à indução da pitiose experimental (Mendoza *et al.*, 1996). Witkamp (1924) foi o primeiro pesquisador a descrever a reprodução experimental da pitiose utilizando coelhos. Desde então, este animal é reconhecido como a única opção para a realização de experimentos *in vivo* sobre a pitiose.

A indução da pitiose descrita por Witkamp (1924) foi realizada após a injeção de granulomas eosinofílicos ou hifas. Na década de 1980, Miller e Campbell (1983) utilizaram os zoósporos de *P. insidiosum* como unidades infectantes e comprovaram que ambos os grupos de coelhos hígidos ou submetidos à imunossupressão desenvolveram a doença, concluindo que esta doença pode ser experimentalmente induzida em coelhos imunocompetentes. Desde então, este modelo tem sido utilizado para avaliar o diagnóstico, a suscetibilidade aos antimicrobianos, a imunoterapia e a resposta imunológica da pitiose (Santurio *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Bach *et al.*, 2010; Botton *et al.*, 2011; Argenta *et al.*,

2012; Loreto *et al.*, 2012; Bach *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2013; Zanette *et al.*, 2013a; Zanette *et al.*, 2013b; Fonseca *et al.*, 2015a; Zanette *et al.*, 2015a; Jesus *et al.*, 2016).

Os motivos da maioria dos animais experimentais serem refratários à indução da pitiose são desconhecidos e provavelmente estejam associados com as diferenças da resposta imunológica que cada hospedeiro desenvolve (Mendoza e Newton, 2005). Embora os modelos utilizando coelhos sejam bastante úteis para o estudo de infecções fúngicas e seu tratamento, eles são mais caros para aquisição, sua criação exige instalações especiais e acompanhamento cuidadoso, e mais importante, há poucos reagentes imunológicos e moleculares disponíveis quando comparado aos *kits* laboratoriais desenvolvidos para camundongos e ratos (Capilla *et al.*, 2007).

Diante deste contexto, pesquisas explorando novos modelos experimentais de pitiose são desejados. Recentemente um estudo descreveu o desenvolvimento de infecção experimental em *Drosophila melanogaster* Toll-deficiente (Zanette *et al.*, 2013d). No entanto, não há estudos sobre pitiose experimental que suportem a utilização de outros animais vertebrados além dos coelhos.

1.2.3 Parede celular dos fungos

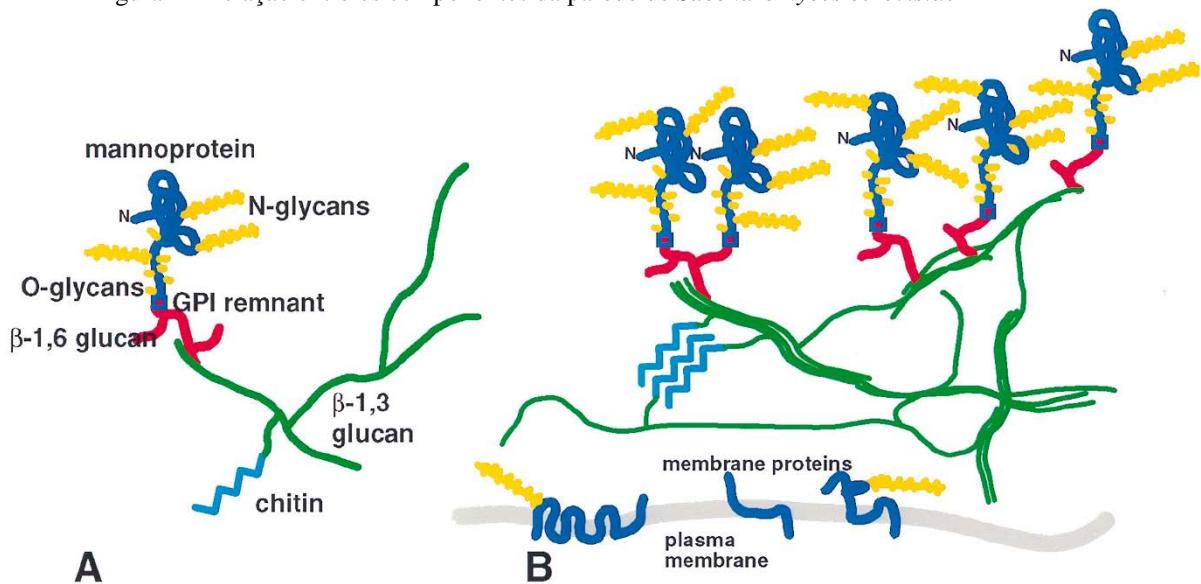
A parede celular dos fungos saprofíticos e patogênicos é composta de proteínas, lipídeos e carboidratos. As células fúngicas são rodeadas por uma parede celular que consiste de quatro componentes principais: glucana, quitina, manana e mananoproteína, sendo que os mesmos desempenham um papel importante na manutenção da forma e na viabilidade das células fúngicas durante as variações osmóticas e são também, o ponto de contato com o meio externo (Lowman *et al.*, 2011). A parede celular compreende cerca de 20 a 30% do peso seco da célula fúngica e a composição varia de acordo com as condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial, com o ciclo celular e com a espécie fúngica (Bowman e Free, 2006).

As glucanas são homopolissacarídeos constituídos por moléculas de glicose, interligadas por ligações glicosídicas que podem ser do tipo alfa (α) ou beta (β). As β -glucanas são a forma predominante e ocorrem principalmente em cadeias lineares, que podem ou não serem ramificadas e a conformação pode variar de simples até tripla hélice, que é a forma mais comum. A quitina é um homopolímero linear, formado por resíduos de N-acetylglucosamina interligados de forma β -(1,4). As mananas são homopolímeros longos constituídos de α -D-manoose e quando ligados à moléculas de peptídeos formam as mananoproteínas (Orlean, 2012). Outros tipos de polissacarídeos foram descritos, por exemplo, galactomananas

(galactofuranose/galactose + manose) presentes em *Aspergillus* spp (Bardalaye e Nordin, 1977; Bernard e Latge, 2001), glicuronoxilomananas (ácido glicurônico + xilose + manose) e galactoxilomananas (galactose + xilose + manose) em *Cryptococcus neoformans* (Vecchiarelli et al., 2011).

O principal carboidrato que compõe a parede celular fúngica é a β -1,3- glucana, com função de manter a rigidez da parede celular e formar uma rede estrutural na qual as outras moléculas irão ligar-se (Deslandes et al., 1980; Lowman et al., 2011). Tem sido sugerido que a quitina realize ligações cruzadas com β -1,3- e β -1,6- glucanas (Cabib, 2009). As cadeias laterais de β -1,6- glucana ligadas à uma cadeia linear de β -1,3- glucana têm sido relatadas para diversas espécies fúngicas e teriam por finalidade estabilizar a parede celular, uma vez que desempenham um papel central como um ligante para componentes específicos da parede celular, incluindo quitina e mananoproteínas além das β -1,3- glucanas (Lipke e Ovalle, 1998; Lowman et al., 2011). As mananoproteínas apresentam uma molécula de ancoragem, glicosilfosfatidilinositol (GPI – do inglês “glycosyl phosphatidylinositol”), que será clivada e irá formar uma ligação glicosídica com uma β -1,6- glucana ramificada, que por sua vez estará ligada glicosidicamente ao complexo β -1,3- glucana – quitina formando assim a rede de fibras do interior da parede celular (Kollar et al., 1997; Bowman e Free, 2006) (Figura 2).

Figura 2 - Relação entre os componentes da parede de *Saccharomyces cerevisiae*



(A) mananoproteínas em azul e oligossacarídeos em amarelo; (B) módulos de associação para formação da estrutura da parede. Fonte: Lipke e Ovalle (1998).

1.2.3.1 Parede celular de *Pythium insidiosum*

A parede celular é vital para os patógenos e por esse motivo, representa um alvo interessante no controle de doenças, o que pode ser exemplificado pelo efeito dos fármacos da família das equinocandinas, que bloqueiam especificamente a biossíntese de β -(1,3)-glucana de *Candida albicans*, o que leva à morte do micro-organismo (Morrison, 2006). Apesar das equinocandinas não terem efeito antimicrobiano sobre *P. insidiosum* capaz de torná-las uma opção terapêutica da pitiose (Pereira *et al.*, 2007; Pereira, 2008), uma melhor compreensão da estrutura de carboidratos de *P. insidiosum* é de grande relevância, pois pode permitir a identificação de rotas bioquímicas que podem ser especificamente bloqueadas, inibindo o crescimento desse patógeno.

Embora *P. insidiosum* forme estruturas micelianas similares aos fungos verdadeiros, ele é classificado em um grupo taxonômico completamente diferente (Straminipila), juntamente com as algas diatomáceas e marrons (Beakes *et al.*, 2012). Avaliações de outras espécies de oomicetos demonstraram que, ao contrário dos fungos que contém quantidades consideráveis de quitina na parede celular, estes micro-organismos não contêm ou apresentam pequenas quantidades (<1%) de quitina e apresentam celulose na parede celular juntamente com uma grande proporção (80 a 90%) de outros carboidratos (Aronson *et al.*, 1967; Sietsma *et al.*, 1969), podendo então ser distinguidos bioquimicamente de fungos verdadeiros pelas diferenças na composição polissacarídica de suas paredes celulares.

Os trabalhos pioneiros sobre os oomicetos descrevem que a parede celular desta classe de micro-organismos consiste essencialmente de 1,3- β - e 1,6- β -glucanas (Aronson *et al.*, 1967; Bartnicki-Garcia, 1968). Estudo subsequente demonstrou que a parede celular de cinco diferentes espécies de *Pythium* era formada principalmente por glucanas (80%), lipídeos (8%), proteínas (2%) e outros açúcares (Vaziri-Tehrani e Dick, 1980). A avaliação da composição da parede celular de *Pythium aphanidermatum* evidenciou um conteúdo de 18% de celulose e 82% de (1→3),(1→6)- β -glucanas (Blaschek *et al.*, 1992). Trabalho recente de Melida *et al.* (2013) com dez espécies de oomicetos das Ordens Peronosporales e Saprolegniales demonstrou que apesar de conterem o mesmo padrão de glucanas, as espécies estudadas apresentaram três tipos diferentes de parede celular de acordo com o modo como as moléculas estão interligadas (espécies de *Pythium* não foram avaliadas).

Em um estudo de Shipton *et al.* (1982) com amostras de *Pythium* isolados de infecções em equinos, muito provavelmente *P. insidiosum*, porém ainda não identificado na época, foi avaliada a composição de açúcares da parede celular que mostrou a glicose como principal

componente e traços de manose, galactose e ramnose. Estudos específicos sobre a composição da parede celular de *P. insidiosum* não foram encontrados na literatura.

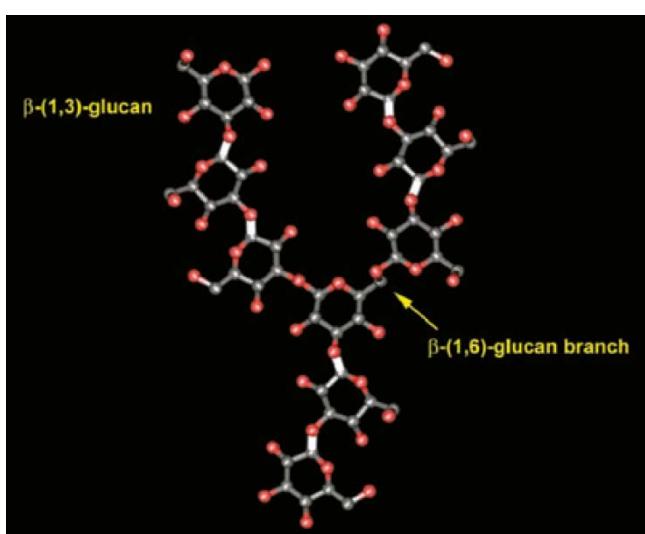
1.2.3.2 Glucanas fúngicas

As glucanas constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos naturais, que consistem de monômeros de D-glicose unidos através de ligações α - ou β -glicosídicas. Elas tem importância como elementos estruturais da parede celular ou servem como armazenamento de energia em bactérias, fungos, incluindo leveduras, algas, plantas e não ocorrem nos tecidos de vertebrados e invertebrados (Brown e Gordon, 2005).

Apesar da simplicidade de sua composição de monossacarídeos (por definição contêm apenas D-glicose), encontra-se uma grande diversidade de glucanas que variam de acordo com o número e a configuração anomérica das unidades de D-glicopiranose, a posição e a sequência de ligações glicosídicas ao longo da cadeia, ao grau de ramificação e conformação estrutural da cadeia (Synytsya e Novak, 2013).

De acordo com a estrutura anomérica é possível distinguir três grupos principais de glucanas: α -D-glucanas, β -D-glucanas e α, β -D-glucanas. Com base nas ligações glicosídicas elas podem ser lineares simples ou ramificadas do tipo (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6). As glucanas fúngicas de maior interesse por sua atividade biológica são as β -glucanas, principalmente as com ligações glicosídicas do tipo β - (1 \rightarrow 3) e β - (1 \rightarrow 6) (Chen e Seviour, 2007) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura das β -glucanas.



As β -glucanas microbianas imunoestimulantes mais comumente são β -(1,3)-glucanas com graus variados de β -(1,6)-glucanas ramificadas. Fonte: Goodridge *et al.* (2009)

Dependendo da estrutura das β -glucanas elas podem ser solúveis, formadoras de gel e formadoras de partículas (insolúveis). Os diferentes graus de solubilidade observados podem ser explicados com base nos diferentes comprimentos dos polímeros e no grau de ramificação dos mesmos, de forma geral, as cadeias lineares de β -1,3- glucana são solúveis e conforme aumenta o tamanho da cadeia e o número de ramificações do tipo β -1,6- a solubilidade diminui (Zekovic *et al.*, 2005).

As análises estruturais são de suma importância, pois provêem informações sobre a estrutura primária, pureza e a composição da glucana em estudo. Para determinar a exata estrutura das β -glucanas, diferentes métodos analíticos são aplicados. Inicialmente aplicam-se métodos de lise química, tais como: metilação, oxidação, degradação de Smith entre outros. Na sequência, o uso de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é o método mais efetivo e menos destrutivo de análise estrutural e tem sido amplamente utilizado na caracterização de glucanas fúngicas (Synytsya e Novak, 2013).

A qualidade mais importante das β -glucanas e a principal razão pela qual muitos estudos vêm sendo realizados são os efeitos fisiológicos que elas produzem. As β -glucanas são consideradas modificadoras de resposta biológica com pronunciada atividade imunomoduladora (Bohn e Bemiller, 1995; Novak e Vetvicka, 2009). De forma geral, imunomoduladores podem agir positivamente sobre o organismo, como imunoestimulantes, ou podem afetar o organismo de forma negativa, como imunossupressores. As β -glucanas apresentam atividade imunoestimulante descrita sobre diversas espécies animais, entre elas: minhocas, camarões, peixes, camundongos, ratos, coelhos, ovelhas, porcos, bovinos e humanos, como revisado por Novak e Vetvicka (2009). Muito antes das β -glucanas serem identificadas como imunomoduladoras, o efeito benéfico de cogumelos ricos em β -glucanas como o shiitake (*Lentinan edodes*) no Japão ou Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) na China já eram utilizados pela medicina oriental para o fortalecimento do sistema imunológico (Stier *et al.*, 2014).

Existe um grande número de β -glucanas extraídas de diferentes fontes e já avaliadas, mas é impossível determinar se há um tipo específico que apresente a melhor atividade imunomoduladora (Novak e Vetvicka, 2009; Synytsya e Novak, 2013). As atividades biológicas das β -glucanas são influenciadas por diferentes parâmetros físico-químicos, como o grau de ramificação, a solubilidade, o peso e a estrutura molecular, entre outros e esses parâmetros, por sua vez, dependem não só da fonte de extração, mas também dos métodos utilizados durante o processo de extração (Synytsya e Novak, 2013).

Desde a descoberta das propriedades benéficas das β -glucanas para animais e humanos, diferentes métodos de extração vêm sendo empregados para a obtenção desse polissacarídeo, principalmente, da levedura *Saccharomyces cerevisiae* oriunda da produção industrial de etanol (Freimund *et al.*, 2003). Os métodos tradicionais de extração de β -glucanas da *S. cerevisiae* baseiam-se em repetidas extrações utilizando soluções ácidas ou alcalinas, o que resulta em degradação das cadeias de β -glucanas e liberação das mesmas para o sobrenadante, resultando em baixo rendimento da extração, além de influenciar a atividade biológica (Chema *et al.*, 2015). Com o intuito de aumentar o rendimento da extração e minimizar a degradação das betaglucanas novos métodos têm sido propostos. Nesse sentido, o método proposto por Liu *et al.* (2008) e composto pelas etapas de autólise induzida, tratamento por água quente e solventes orgânicos, homogeneização e tratamento enzimático com protease demonstrou alto grau de rendimento, de pureza e manteve a estrutura original das β -glucanas.

Diferentes vias imunológicas têm sido relacionadas às atividades biológicas exercidas pelas β -glucanas, incluindo: ativação de macrófagos, estimulação de células T auxiliar, ativação do sistema retículo-endotelial, ativação de células NK (natural killer), ativação das vias clássica e alternativa do complemento e estímulo da produção de anticorpos (Vannucci *et al.*, 2013). Uma vez que as β -glucanas induzem uma ampla gama de respostas imunitárias, elas podem ser reconhecidas por um ou múltiplos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) presentes na superfície de diferentes células do sistema imune, entre eles: receptor 3 do complemento (CR3), lactosilceramidas, receptores *scavenger*, receptores Toll-like (TLR) e dectin-1 (Novak e Vetvicka, 2008; Vannucci *et al.*, 2013). Os PRRs mais importantes para o reconhecimento de β -glucanas são o Dectin-1, o CR3 e o TLR, que são encontrados em várias células, tais como: monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, células NK e células epiteliais do intestino (Stier *et al.*, 2014).

O exato mecanismo pelo qual as β -glucanas afetam o sistema imune deve-se, em parte, a rota de administração. Quando administradas de forma oral, o impacto sobre a função imune é primariamente explicado pela interação da β -glucanas com as células M localizadas no intestino delgado. As células M seriam responsáveis por englobar as β -glucanas do lúmen intestinal e transportá-las para as células imunológicas localizadas dentro das placas de Peyer (Volman *et al.*, 2008). Administradas por via intraperitoneal e intravenosa as betaglucanas são primariamente distribuídas para o fígado e o baço (Suda *et al.*, 1995). Via subcutânea, as β -glucanas serão primariamente reconhecidas pelos receptores das células epiteliais, macrófagos teciduais e células dendríticas (Novak e Vetvicka, 2009; Vetvicka, 2011).

Algumas das principais atividades farmacológicas descritas para as β -glucanas são: aumento da resistência do hospedeiro à infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias (Zekovic *et al.*, 2005; Chen e Seviour, 2007; Novak e Vetzicka, 2008; Minari *et al.*, 2011; Giavasis, 2014); antioxidante (Ceyhan *et al.*, 2012), anti-inflamatória (Du *et al.*, 2015) efeito antitumoral (Qi *et al.*, 2011; Vannucci *et al.*, 2013), protetora contra infecções fúngicas (Clemons *et al.*, 2014; Clemons *et al.*, 2015).

1.2.4 Imunologia das infecções fúngicas

Os fungos estão associados a um amplo espectro de doenças em humanos e animais, que vão desde manifestações pulmonares e lesões cutâneas autolimitadas até severas doenças inflamatórias e graves infecções fatais (Romani, 2011). O estabelecimento e a gravidade das infecções irão depender da ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro pelo micro-organismo invasor e da consequente resposta imune desencadeada (Blanco e Garcia, 2008).

A resposta imune do hospedeiro é iniciada através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e padrões associados ao dano molecular (DAMPs) presentes durante a infecção pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Os PRRs estão presentes nas células imunes da linhagem mielóide (células dendríticas, macrófagos, monócitos e neutrófilos) e não mielóide (células epiteliais e endoteliais) (ROMANI, 2011). A ligação dos PRRs aos PAMPs fúngicos, tais como polissacarídeos (quitina, α e β -glucanas, mananas) e DNA fúngico, resulta na ativação de vias de sinalização intracelular promovendo a fagocitose, a produção de citocinas, “burst” respiratório e maturação celular (NETEA *et al.*, 2008). Esta ativação representa a primeira linha de defesa do hospedeiro e faz parte do mecanismo de defesa inato, conferindo rápido reconhecimento do patógeno, liberação de citocinas pró-inflamatórias e sinalizadoras do sistema imune adaptativo (Steele e Wormley, 2012).

Diferentes PRRs estão relacionados ao reconhecimento de componentes da parede celular dos fungos, dentre eles, receptores Toll-like (TLR), receptores lectina tipo C (CLR) e as proteínas da família galectinas (Romani, 2011). Os PRRs presentes em diferentes células fagocíticas iniciam eventos intracelulares que promovem a ativação do sistema imunológico e a depuração dos fungos, com a resposta imune específica gerada dependendo do tipo de célula envolvida (monócitos, macrófagos e neutrófilos) (Levitz, 2010). A indução da imunidade inata por meio da ativação de PRRs fornece a base para desenvolver uma resposta imune adaptativa

subsequente e as células dendríticas constituem a interface entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo (Wuthrich *et al.*, 2012).

A produção de citocinas que ocorre após a interação dos PRRs com os PAMPs fúngicos, representa um passo fundamental na diferenciação das células T helper virgem (Th0) nos diferentes subtipos: Th1, Th2, Th17 e T regulatória (Treg) durante o processo de resposta imune e após a ativação, os subtipos de células T expressarão diferentes citocinas que irão mediar distintas funções efetoras. O consenso geral é de que respostas celulares Th1 são o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra fungos patogênicos, enquanto respostas Th2 estão relacionadas com a suscetibilidade a infecções ou a respostas alérgicas (Van De Veerdonk e Netea, 2010).

As respostas imunes com predomínio de células Th1 estão relacionadas à imunidade protetora contra fungos e a vacinas antifúngicas efetivas (Romani, 2011). Interferon- γ (INF- γ) é a principal citocina produzida pelos linfócitos Th1 e é importante para a estimulação da atividade antifúngica dos neutrófilos (Van De Veerdonk e Netea, 2010). IL-4, IL-5 e IL-13 são citocinas produzidas durante respostas imunes Th2 e promovem uma via alternativa de ativação de macrófagos, favorecendo a infecção fúngica e respostas alérgicas associadas aos fungos, além de estarem relacionadas à recidiva da doença (Romani, 2011). As respostas Th17 são caracterizadas pela produção de IL-17, atuando na defesa do hospedeiro contra certas bactérias extracelulares e fungos (Bar *et al.*, 2014) e estão relacionadas a vacinas com resposta protetora contra infecções fúngicas experimentais (Wuthrich *et al.*, 2011).

As células Treg, através da produção de IL-10 tem como função moderar a resposta inflamatória durante a infecção para limitar o dano às células do hospedeiro e restaurar a homeostase do organismo (Belkaid e Tarbell, 2009). No entanto, essa resposta pode limitar a eficácia da resposta imune protetora em consequência da redução da atividade pró-inflamatória gerando persistência do fungo no tecido e podendo levar à imunossupressão (Van De Veerdonk e Netea, 2010).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Determinar o padrão de suscetibilidade *in vitro* de *Conidiobolus lamprauges*, avaliar métodos de diagnóstico diferencial e o potencial imunomodulador de β-glucanas extraídas de *Pythium insidiosum*, além de estabelecer um modelo experimental de pitiose em camundongos.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a suscetibilidade *in vitro* do *Conidiobolus lamprauges* frente aos antifúngicos poliênicos (anfotericina B), azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol), equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina), alilaminas (terbinafina) e flucitosina.

- Avaliar o potencial sinérgico da combinação do sulfametoxazol+trimetoprima com antifúngicos poliênicos, triazólicos, equinocandinas e terbinafina frente a *Conidiobolus lamprauges*.

- Padronizar a técnica de disco difusão com discos de minociclina como um método de screening para a identificação presuntiva de *Pythium insidiosum* bem como sua diferenciação de *C. lamprauges* e outros fungos verdadeiros.

- Quantificar o conteúdo de glucanas presente no micélio de isolados clínicos de *P. insidiosum*

- Realizar a extração de β-glucanas do micélio de *P. insidiosum*, utilizando a cepa Pi-135, caracterizando o extrato obtido quanto ao conteúdo de β-glucanas e proteínas e avaliando a estrutura química da β-glucana obtida;

- Determinar o potencial imunomodulador das β-glucanas extraídas do micélio de *P. insidiosum* pela imunização de camundongos BALB/c, através da dosagem de citocinas (Th1, Th2 e Th17);

- Estabelecer um novo modelo de pitiose experimental utilizando camundongos BALB/c;

- Avaliar a resposta imunológica gerada pela pitiose experimental em camundongos através da dosagem de citocinas (Th1, Th2 e Th17).

1.4 APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem esta tese de doutorado estão apresentados sob a forma de *artigos científicos integrados*, de acordo com as normas do *Manual de Dissertações e teses da UFSM* publicado em 2015. Os artigos publicados estão com a formatação final de acordo com as normas de cada periódico. Os manuscritos foram formatados de acordo com as normas dos periódicos para os quais serão submetidos. Os referenciais teóricos dos artigos e dos manuscritos estão listados nas respectivas seções de cada artigo/manuscrito e não foram duplicados na lista de referências final da tese.

2 ARTIGO 1 - *IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF CONIDIOBOLUS LAMPRAUGES RECOVERED FROM SHEEP TO ANTIFUNGAL AGENTS*

Artigo no formato *Short Communication* publicado no periódico
Veterinary Microbiology
(ISSN: 0378-1135)

Author's personal copy

Veterinary Microbiology 166 (2013) 690–693



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

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

Short communication

In vitro susceptibility of *Conidiobolus lamprauges* recovered from sheep to antifungal agents

Juliana Simoni Moraes Tondolo^a, Érico Silva de Loreto^a, Valéria Dutra^b,
 Luciano Nakazato^b, Daphne Ariadne Jesus de Paula^b, Régis Adriel Zanette^a,
 Sydney Hartz Alves^c, Janio Morais Santurio^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2013

Received in revised form 13 July 2013

Accepted 20 July 2013

Keywords:

Conidiobolomycosis
 Susceptibility testing
 Terbinafine

ABSTRACT

Data regarding the susceptibility of *Conidiobolus lamprauges* is limited and there is no consensus about the optimal treatment for infections caused by *Conidiobolus* spp. In this context, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of six *C. lamprauges* strains isolated from sheep conidiobolomycosis to amphotericin B, ketoconazole, fluconazole, itraconazole, posaconazole, voriconazole, anidulafungin, caspofungin, micafungin, flucytosine, and terbinafine using the CLSI M38-A2 microdilution technique. Terbinafine was the most active (MIC range <0.06–0.5 µg/mL). Resistance or reduced susceptibility was observed for amphotericin B and azole and echinocandin antifungals. Additional studies are necessary to determine the therapeutic potential of terbinafine as monotherapy or in combination therapy with other antifungals.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Entomophthoramycosis caused by *Conidiobolus lamprauges* is a rare and chronic, pyogranulomatous, subcutaneous disease of humans and other mammals, such as horses and sheep (de Paula et al., 2010; Furlan et al., 2010; Humber et al., 1989; Kimura et al., 2011; Vilela et al., 2010). The disease presents clinically with involvement of the nasopharyngeal region, affecting the ethmoidal region, turbinate bones, and occasionally, the central nervous system, lymph nodes, and pleura (de Paula et al., 2010; Furlan et al., 2010; Humber et al., 1989; Vilela et al., 2010).

However, the recent first description of this species causing a fatal disseminated human fungal infection (Kimura et al., 2011) highlights the need for a better clinical and laboratory understanding of this species.

There is no consensus about the optimal treatment for infections caused by *Conidiobolus* spp. A saturated solutions of potassium iodide (SSKI), azole and echinocandin antifungals, terbinafine, amphotericin B, and flucytosine administered as monotherapy or in combinations have been described in cases of therapeutic success and failure (Bento et al., 2010; Choon et al., 2012; Chowdhary et al., 2010; Isa-Isa et al., 2012; Kimura et al., 2011; Reiss et al., 2012; Walker et al., 1992; Walsh et al., 1994), and reports evaluating the susceptibility of *Conidiobolus* spp. have shown decreased susceptibility or resistance to most antifungal agents (Bento et al., 2010; Fischer et al., 2008; Guarro et al., 1999; Hawkins et al., 2006; Kimura et al., 2011; Walsh et al., 1994). In this context, the aim of

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima n° 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8906; fax: +55 55 3220 8906.
 E-mail address: janio.santurio@gmail.com (J.M. Santurio).

Author's personal copy

J.S.M. Tondolo et al. / Veterinary Microbiology 166 (2013) 690–693

691

this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of *C. lampragues* to antifungal agents using the CLSI M38-A2 microdilution technique.

2. Materials and methods

We evaluated the susceptibility of six *C. lampragues* strains isolated from cases of sheep conidiobolomycosis that were previously identified by molecular phylogenetic analyses based on 18S ribosomal DNA (de Paula et al., 2010). All sheep had a granulomatous reaction in the nasopharyngeal region that extended to the turbinates, nasal sinuses, orbit, and cribriform plate, with frequent invasion of the brain.

Amphotericin B (AMB, Sigma[®]), azole antifungals [ketoconazole (KTZ, Janssen-Cilag Pharmaceutica[®]), fluconazole (FLZ, Sigma[®]), itraconazole (ITZ, Janssen Pharmaceutica[®]), posaconazole (POS, Schering-Plough[®]), and voriconazole (VRZ, Pfizer[®]], echinocandins [anidulafungin (AND, Pfizer[®]), caspofungin (CAS, Merck[®]), and micafungin (MYC, Astellas[®])], flucytosine (5FC, Sigma[®]), and terbinafine (TRB, Novartis[®]) were obtained commercially and were diluted in dimethylsulfoxide or distilled water to generate stock solutions.

The susceptibility tests were performed following the CLSI M38-A2 protocol (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). Briefly, all isolates were grown on potato dextrose agar for seven days at 35 °C. The colonies were covered with approximately 1 mL of sterile 0.85% saline, and a suspension was obtained by gently probing the colonies with the tip of a transfer pipette. This suspension was transferred to a sterile tube and after allowing hyphal fragments to settle for 5 min, the upper homogeneous suspension was transferred to a new sterile tube and mixed with a vortex mixer for 15 s. The densities of the conidial suspensions were adjusted to an optical density at 530 nm that ranged from 0.15 to 0.17 and then diluted 1:50 in RPMI 1640 broth (with L-glutamine and glucose, buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS) to obtain inocula

twofold more concentrated than the density required (0.4×10^4 to 5×10^4 CFU/mL). The tests were performed in microdilution trays and the minimum inhibitory concentrations (MICs) were scaled as MIC-1 (100% visible-growth inhibition for AMB, ITZ, POS, and VRZ) and MIC-2 (50% (KTZ, FLZ, and 5FC) or 80% (TRB) visible-growth inhibition). Minimum effective concentration (MEC) was defined as the minimal drug concentration producing short, stubby, highly branched hyphae for AND, CAS, and MYC. MICs and MECs were determined at 24 and 48 h and performed in duplicate.

The minimum fungicidal concentrations (MFCs) were determined by subculturing 100 µL from each well without visual detectable growth into 1 mL of sterile Sabouraud broth and incubating the mixture at 35 °C for 7 days. The geometric means (GMs) of off-scale MICs were converted to the next lowest or next highest concentration.

3. Results

The results are summarized in Table 1. TRB was considered the most effective drug tested for the *in vitro* inhibition of *C. lampragues*, with MIC-2 (GM) values ranging from <0.06 to 0.5 (0.12) µg/mL at both 24 and 48 h. MIC-1 (GM) values ranged from 0.5 to 1 (0.56 [24 h]; 1.0 [48 h]) µg/mL for AMB, 1 to 32 (4) µg/mL for ITZ, 2 to >32 (8) µg/mL for POS, and >16 µg/mL for VRZ. MIC-2 (GM) values ranged from 8 to 32 (14.25) µg/mL for KTZ and >64 µg/mL for both FLZ and 5FC. The AND, CAS, and MYC MEC were >8 µg/mL. The MFCs (GM) ranged from 0.25 to 2 (0.79) µg/mL for TRB, 2–4 (3.17) µg/mL for AMB, 2 to >32 (8) µg/mL for ITZ and 2 to >32 (12.7) µg/mL for POS.

4. Discussion

Conidiobolus spp. are saprophytes that are distributed widely and are found in soil and decaying organic material. Among the more than 25 described species, *C. coronatus*, *C. incongruus*, and *C. lampragues* are known to cause diseases

Table 1
Antifungal activities of antifungal drugs against six isolates of *Conidiobolus lampragues*.

	MIC/MEC range (GM)		MFC range (GM)
	24 h	48 h	
MIC-1			
Amphotericin B	0.5–1 (0.56)	1 (1)	2–4 (3.17)
Itraconazole	1–32 (4)	1–32 (4)	2–>32 (8)
Posaconazole	2–>32 (8)	2–>32 (8)	2–>32 (12.7)
Voriconazole	>16	>16	>16
MIC-2			
Terbinafine	<0.06–0.5 (0.12)	<0.06–0.5 (0.12)	0.25–2 (0.79)
Ketoconazole	8–32 (14.25)	8–32 (14.25)	32–>32 (> 32)
Fluconazole	>64	>64	>64
Flucytosine	>64	>64	>64
MEC			
Anidulafungin	>8	>8	>8
Caspofungin	>8	>8	>8
Micafungin	>8	>8	>8

MIC, minimum inhibitory concentrations; MFC, minimum fungicidal concentrations; GM, geometric mean; MIC-1, 100% visible-growth inhibition; MIC-2, 50% (ketoconazole, fluconazole, flucytosine) or 80% (terbinafine) visible-growth inhibition; MEC, minimum effective concentration.

Author's personal copy

692

J.S.M. Tondolo et al. / Veterinary Microbiology 166 (2013) 690–693

in humans and animals (de Paula et al., 2010; Furlan et al., 2010; Humber et al., 1989; Kimura et al., 2011; Reiss et al., 2012). While *C. coronatus* and *C. incongruus* have been described in several cases of human and animal conidiobolomycosis, *C. lamprae* infection was first described in an Arabian mare (Humber et al., 1989) in 1989. Three other articles describing the involvement of the nasal cavity in sheep were published in 2010 (de Paula et al., 2010; Furlan et al., 2010; Vilela et al., 2010), and the first human case of disseminated mycosis was described in 2011 (Kimura et al., 2011).

Although no antifungal susceptibility protocols or breakpoints have been defined for *C. lamprae*, interpretative guidelines based on the M38-A2 protocol for other filamentous fungi suggest that the six isolates tested in this study showed resistance or reduced susceptibility to all antifungal agents tested, with a likely exception to TRB.

Information regarding the susceptibility of *C. lamprae* is scarce. Guarro et al. (1999) described one isolate resistant to all of the antifungal agents tested, with MICs of 8 µg/mL for AMB, KTZ, and miconazole (MON), 32 µg/mL for FLZ and ITZ, and 256 µg/mL for 5FC. Kimura et al. (2011) determined the antifungal susceptibility of isolates recovered from the human disseminated case and found MICs (24 h and 48 h) for AMB (4 and 8 µg/mL), ITZ (0.5 and 1 µg/mL), posaconazole (POS) (4 and 4 µg/mL), MON (0.25 and 1 µg/mL), and TRB (0.03 and 0.125), whereas resistance was observed for AND, CAS, MYC (>8 µg/mL), and VRZ (>16 µg/mL). Additionally, they interpreted the *in vitro* interactions of ITZ/TRB and POS/TRB as indifferent.

Fluconazole and voriconazole are not active against Mucorales *in vitro* (Sun et al., 2002). In fact, the prophylactic and therapeutic use of voriconazole and caspofungin has been associated with breakthrough disseminated mucormycosis (Blin et al., 2004; Imhof et al., 2004; Marty et al., 2004; Oren, 2005). Indeed, *in vitro* pretreatment of Mucorales with voriconazole increases the virulence of these organisms in experimental models of mucormycosis (Lamaris et al., 2009). In this context, it is not surprising that the *C. lamprae* isolates evaluated demonstrate reduced susceptibilities to these antifungal.

However, susceptibility testing for *Conidiobolus* spp. should be interpreted cautiously. Hawkins et al. (2006) reported the successful treatment of a patient with the diagnosis of *Conidiobolus* spp. pneumonia with ITZ, which presented resistance *in vitro* to AMB (MIC of 4 µg/mL), FLZ (>64 µg/mL), and ITZ (>8 µg/mL). Similarly, favorable treatment outcomes have been reported with SSKI (MICs > 20,000 µg/mL) (Bento et al., 2010; Yangco et al., 1984), TRB, and ITZ (Fischer et al., 2008) as well as other antifungals (Bauer et al., 1997; Choon et al., 2012; Reiss et al., 2012; Tan et al., 2005; Valle et al., 2001; Yang et al., 2010), despite their reduced susceptibility or resistance *in vitro*, indicating that there are undefined factors for understanding the relationship between the susceptibility test and the treatment of conidiobolomycosis.

It is important to note that due to the small number of isolates evaluated in this study and the lack of information in the literature, we cannot characterize a profile of susceptibility of *C. lamprae* or perform clinical

correlations. Larger susceptibility studies on a greater number of isolates should be done, with emphasis on the development of methodologies that allow the identification of antifungal resistance, which must be accomplished by using clinical breakpoints (Espinol-Ingraffo et al., 2013).

5. Conclusion

In conclusion, the *in vitro* data reported herein suggest that *C. lamprae* has reduced susceptibility to amphotericin B, azole antifungals, and the echinocandins evaluated. Terbinafine was the most active drug. Further studies are needed to determine the therapeutic potential of terbinafine as monotherapy or in combination therapy with other antifungals.

Acknowledgement

Érico Silva de Loreto is financially supported by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (PNPD-CAPES).

References

- Bauer, R.W., Lemarie, S.L., Roy, A.F., 1997. *Oral conidiobolomycosis in a dog*. *Vet. Dermatol.* **8**, 115–120.
- Bento, D.P., Tavares, R., Martins Mda, L., Faria, N., Maduro, A.P., Araujo, C., Ventura, F., Mansinho, K., 2010. *Atypical presentation of entomophthoromycosis caused by Conidiobolus coronatus*. *Med. Mycol.* **48**, 1099–1104.
- Blin, N., Morineau, N., Gaillard, F., Morin, O., Milpied, N., Harousseau, J.L., Moreau, P., 2004. *Disseminated mucormycosis associated with invasive pulmonary aspergillosis in a patient treated for post-transplant high-grade non-Hodgkin's lymphoma*. *Leuk. Lymphoma* **45**, 2161–2163.
- Choon, S.E., Kang, J., Neafie, R.C., Ragsdale, B., Klassen-Fischer, M., Carlson, J.A., 2012. *Conidiobolomycosis in a young Malaysian woman showing chronic localized fibrosing leukocytoclastic vasculitis: a case report and meta-analysis focusing on clinicopathologic and therapeutic correlations with outcome*. *Am. J. Dermatopathol.* **34**, 511–522.
- Chowdhary, A., Randhawa, H.S., Khan, Z.U., Ahmad, S., Khanna, G., Gupta, R., Chakrabarti, A., Roy, P., 2010. *Rhinoentomophthoromycosis due to Conidiobolus coronatus. A case report and an overview of the disease in India*. *Med. Mycol.* **48**, 870–879.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard*, 2nd ed. CLSI, Wayne, PA, pp. 35 M38-A2.
- de Paula, D.A., de Oliveira Filho, J.X., da Silva, M.C., Colodel, E.M., Broetto, L., Pinto, P.M., Schrank, A., Nakazato, L., Dutra, V., 2010. *Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **22**, 274–277.
- Espinol-Ingraffo, A., Cuenca-Estrella, M., Cantón, E., 2013. *EUCAST and CLSI: working together towards a harmonized method for antifungal susceptibility testing*. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **7**, 59–67.
- Fischer, N., Ruef, C., Ebner, C., Bachli, E.B., 2008. *Rhinofacial Conidiobolus coronatus infection presenting with nasal enlargement*. *Infection* **36**, 594–596.
- Furlan, F.H., Lucioli, J., Veronezi, L.O., Fonteque, J.H., Traverso, S.D., Nakazato, L., Gava, A., 2010. *Conidiobolomycosis caused by Conidiobolus lamprae in sheep in the state of Santa Catarina, Brazil*. *Pesq. Vet. Bras.* **30**, 529–532.
- Guarro, J., Aguilar, C., Pujol, I., 1999. *In-vitro antifungal susceptibilities of Basidiobolus and Conidiobolus spp. strains*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 557–560.
- Hawkins, E.C., Grooters, A.M., Cowgill, E.S., Proulx, D.R., Davainis, G.M., Ruslander, D.M., Grindem, C.B., 2006. *Treatment of Conidiobolus sp. pneumonia with itraconazole in a dog receiving immunosuppressive therapy*. *J. Vet. Intern. Med.* **20**, 1479–1482.
- Humber, R.A., Brown, C.C., Kornegay, R.W., 1989. *Equine zygomycosis caused by Conidiobolus lamprae*. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 573–576.

Author's personal copy

- Imhof, A., Balajee, S.A., Fredricks, D.N., Englund, J.A., Marr, K.A., 2004. Breakthrough fungal infections in stem cell transplant recipients receiving voriconazole. *Clin. Infect. Dis.* 39, 743–746.
- Isa-Isa, R., Arenas, R., Fernandez, R.F., Isa, M., 2012. Rhinofacial conidiobolomycosis (entomophthoramycosis). *Clin. Dermatol.* 30, 409–412.
- Kimura, M., Yaguchi, T., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Thompson, E.H., Wickes, B.L., 2011. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprae*. *J. Clin. Microbiol.* 49, 752–756.
- Lamaris, G.A., Ben-Ami, R., Lewis, R.E., Chamilos, G., Samonis, G., Kon-toyiannis, D.P., 2009. Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *J. Infect. Dis.* 199, 1399–1406.
- Marty, F.M., Cosimi, L.A., Baden, L.R., 2004. Breakthrough zygomycosis after voriconazole treatment in recipients of hematopoietic stem-cell transplants. *N. Engl. J. Med.* 350, 950–952.
- Oren, I., 2005. Breakthrough zygomycosis during empirical voriconazole therapy in febrile patients with neutropenia. *Clin. Infect. Dis.* 40, 770–771.
- Reiss, E., Shadomy, H.J., Lyon, G.M., 2012. Entomophthoramycosis caused by *Conidiobolus* species. In: Reiss, E., Shadomy, H.J., Lyon, G.M. (Eds.), *Fundamental Medical Mycology*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, pp. 467–474.
- Sun, Q.N., Fothergill, A.W., McCarthy, D.I., Rinaldi, M.G., Graybill, J.R., 2002. In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1581–1582.
- Tan, D.C., Hsu, L.Y., Koh, L.P., Goh, Y.T., Koh, M., 2005. Severe conidiobolomycosis complicating induction chemotherapy in a patient with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 129, 447.
- Valle, A.C., Wanke, B., Lazera, M.S., Monteiro, P.C., Viegas, M.L., 2001. Entomophthoramycosis by *Conidiobolus coronatus*. Report of a case successfully treated with the combination of itraconazole and fluconazole. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 43, 233–236.
- Vilela, R., Silva, S.M., Riet-Correa, F., Dominguez, E., Mendoza, L., 2010. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprae* recovered from infected sheep. *J. Clin. Microbiol.* 48, 427–432.
- Walker, S.D., Clark, R.V., King, C.T., Humphries, J.E., Lytle, L.S., Butkus, D.E., 1992. Fatal disseminated *Conidiobolus coronatus* infection in a renal transplant patient. *Am. J. Clin. Pathol.* 98, 559–564.
- Walsh, T.J., Renshaw, G., Andrews, J., Kwonchung, J., Cunningham, R.C., Pass, H.L., Taubenberger, J., Wilson, W., Pizzo, P.A., 1994. Invasive zygomycosis due to *Conidiobolus incongruus*. *Clin. Infect. Dis.* 19, 423–430.
- Yang, X., Li, Y., Zhou, X., Wang, Y., Geng, S., Liu, H., Yang, Q., Lu, X., Hiruma, M., Sugita, T., Ikeda, S., Ogawa, H., 2010. Rhinofacial conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a Chinese rice farmer. *Mycoses* 53, 369–373.
- Yangco, B.G., Okafor, J.I., TeStrake, D., 1984. In vitro susceptibilities of human and wild-type isolates of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25, 413–416.

**3 MANUSCRITO 1 - *IN VITRO* ASSESSMENT OF ANTIFUNGAL DRUGS AND
SULFAMETHOXAZOLE/TRIMETHOPRIM AGAINST CLINICAL ISOLATES OF
*CONIDILOBOLUS LAMPRAUGES***

Artigo no formato *Short Communication* para submissão ao periódico
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics
(ISSN: 1365-2885)

Title: *In vitro* assessment of antifungal drugs and sulfamethoxazole/trimethoprim against clinical isolates of *Conidiobolus lamprauges*

Short running title: *In vitro* assessment of antimicrobial drugs against *Conidiobolus lamprauges*

Authors: Juliana S. M. Tondolo¹, Érico S. Loreto¹, Francielli P. K. Jesus², Sydney H. Alves³, Janio M. Santurio¹

Affiliation:

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRSG), RS, Brazil

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

#Address for correspondence:

Janio M. Santurio

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: janio.santurio@gmail.com

Abstract

We have determined the *in vitro* activity of sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP) and several antifungal drugs alone and in combination against seven *Conidiobolus lampragues* clinical isolates. The assays were based on the M38-A2 protocol and the checkerboard microdilution method. Terbinafine (TRB) was the most active (MIC_{80} range 0.06-2 $\mu\text{g/mL}$). The main synergism observed was through the combination of SMX with TMP (100%) and TRB with azole antifungal drugs (71%). The observed *in vitro* activities suggest that the combination SMX+TMP and TRB are promising candidate therapies for conidiobolomycosis.

Keywords: conidiobolomycosis, susceptibility testing, terbinafine, sulfamethoxazole, trimethoprim

Conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus* spp. are uncommon fungal infections that can cause nasopharyngeal granulomas and subcutaneous infections in horses, mules, dogs, cats, sheep, nonhuman primates, and humans (Reiss et al., 2012; Chengappa & Pohlman, 2013; Samanta, 2015). *Conidiobolus lamprauges* was described as the pathogenic agent of nasopharyngeal conidiobolomycosis affecting sheep (Furlan et al., 2010), horses (Humber et al., 1989) and in one case of disseminated human conidiobolomycosis (Kimura et al., 2011).

To date, there are no sufficient clinical or *in vitro* data to support a consensus about the optimal treatment of conidiobolomycosis and cases of therapeutic success and failure have been described for all forms of therapy, including surgical excision, antifungal therapy and saturated solutions of potassium iodide (SSKI) (Ribes et al., 2000; Prabhu & Patel, 2004; Bento et al., 2010; Chowdhary et al., 2010; Kimura et al., 2011; Choon et al., 2012; Reiss et al., 2012). Additionally, decreased susceptibility or resistance *in vitro* to most antimicrobial drugs are often reported (Guarro et al., 1999; Fischer et al., 2008; Bento et al., 2010; Tondolo et al., 2013).

Interestingly, therapies using sulfamethoxazole (SMX)/trimethoprim (TMP) associated with antifungals drugs, SSKI, potassium iodide and hyperbaric O₂ therapy are described in cases when clinical improvement and cure were observed (al-Hajjar et al., 1996; Temple et al., 2001; Bento et al., 2010; Yang et al., 2010; Oberdorfer et al., 2012) but also as no effect on the progress of the lesions (Roy & Cameron, 1972; Morris et al., 2001; Valle et al., 2001; Wuppenhorst et al., 2010). However, with an exception of one study (Wuppenhorst et al., 2010) describing a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1 mg/L for SMX/TMP against *Conidiobolus incongruus*, there are no data about the *in vitro* susceptibility profile of SMX/TMP alone or associated with antifungal drugs against *C. lamprauges*. In this context, this study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility profile of antifungal drugs and SMX/TMP, as well as the *in vitro* combination of these drugs against *C. lamprauges*.

Seven Brazilian *C. lamprauges* isolates obtained from cases of sheep with granulomatous reaction in the nasopharyngeal region diagnosed with rhinoconidiobolomycosis were evaluated in this study. The *C. lamprauges* isolates were previously identified by a molecular phylogenetic analysis (de Paula et al., 2010).

Amphotericin B (AMB), azole antifungals (miconazole (MON), posaconazole (POS), voriconazole (VOR)), terbinafine (TRB), caspofungin (CAS), sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) were purchased from Sigma Aldrich® as standard powers. Anidulafungin (ANI, Pfizer®) and micafungin (MFG, Astellas®). All drugs were diluted in dimethylsulfoxide or sterile distilled water to generate stock solutions.

A broth microdilution susceptibility tests (BMD) were performed following the CLSI M38-A2 protocol (Clinical and Laboratory Standards Institute., 2008) as previously described by Tondolo et al. (2013), with the exception of final inocula, which were diluted 1:10 in RPMI 1640 broth. The tests were performed in microdilution trays, and endpoints were determined as the minimum inhibitory concentration (MIC) and as that resulting in aberrant micelia growth (i.e., the minimum effective concentration [MEC]) for the echinocandins drugs.

The interactions between drugs were evaluated using a checkerboard test (Moody, 2007). The lowest fractional inhibitory concentration index (FICI) was determined from the non-turbid wells along with the turbidity/non-turbidity (MICs of 100% of growth inhibition when AMB was associated with other drugs and at least 80% inhibition of growth compared with the growth of control wells for the all others combinations) growth interface after 48 h of incubation at 37°C and interpreted as follows: FICI \leq 0.5, synergism; FICI > 0.05 to \leq 4, indifference; FICI > 4, antagonism.

All the plates were firstly incubated at 37°C for 48h and then, the interpretation of individual MIC (visual), MECs (inverted microscope) and MICs from *checkerboard* test were

recorded 8 hours after the addition of 20 µL (0.5 mg/mL) of the dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to each well.

The evaluation of MICs (in µg/mL, 100% of growth inhibition) demonstrated the follow MIC range (geometric mean [GM]): AMB, 1-2 (1.22); TRB, 1-4 (2.21), MON, 4-16 (7.25), POS, >32; VOR, >512; MFG, 64-256 (141.32), CAS, 256->512 (840); ANI, >512; TMP, 256-512 (380.41); SMX, 128-1024 (724.08). The MECs for ANI, CAS and MFG were > 8 µg/mL. MIC_{80%} [GM] (80% of growth inhibition) were recorded for TRB (0.06-2 [0.74]), SMX (16-64 [26.25]) and TMP (128-512 [282.65]). Table 1 summarizes the *in vitro* synergistic interactions based on the MIC values between SMX and TMP, and between SMX-TMP or TRB associated with the antifungal drugs. The association of SMX and TMP resulted in 100% of synergistic interactions and the interactions of SMX-TMP at a proportion of 1:4, respectively, with all antifungal drugs evaluated resulted in 100% of indifference. Synergistic interactions (71%) were observed when terbinafine was associated with all azole antifungals (MON, POS and VOR) and two isolates (29%) from TRB+MFG combination. All other interactions were indifferent. No antagonistic interaction was observed.

In this study, we observed the synergistic potential of SMX and TMP against *C. lamprauges* and that the interactions of SMX-TMP in a proportion of 1:4, respectively, with the antifungal drugs resulted in indifferent interactions. AMB, TRB and MON were considered the most effective drugs because they required the lowest concentrations for the *in vitro* inhibition of *C. lamprauges*. However, breakpoints have not been determined for mould susceptibility testing and based on breakpoint's suggestion for other filamentous fungi on M38-A2 protocol, it is suggested a predominance of resistance or reduced susceptibility to all antifungal drugs evaluated, with a likely exception to TRB. Highlights also the combination between TRB and azole antifungals for which 71% of interactions were synergistic.

Definitive and interpretative guidelines based on the M38-A2 protocol were not defined for *Conidiobolus* spp.. Thus, based on previous experimental studies, we set the dilution of the inoculum to 1:10 in order to produce more consistent mycelial growth. Interestingly, for POS and VOR, for which end points are commonly easily defined (Clinical and Laboratory Standards Institute., 2008), a persistent partial inhibition (trailing) for all clinical isolates of *C. lamprauges* evaluated was observed.

Susceptibility tests for *C. lamprauges* were previously described in only a few reports (Guarro et al., 1999; Kimura et al., 2011; Tondolo et al., 2013) and presented similar results to those obtained through this study. Additionally, similar and discordant results can be observed on results describing the susceptibility of *C. coronatus* (Taylor et al., 1987; Gugnani, 1992; Korenek et al., 1994; Guarro et al., 1999; Fischer et al., 2008; Bento et al., 2010), *C. incongruus* (Walsh et al., 1994; Guarro et al., 1999; Temple et al., 2001; Wuppenhorst et al., 2010) and *Conidiobolus* spp. (Hawkins et al., 2006; Yang et al., 2010). In this context, *in vitro* testing of *Conidiobolus* species demonstrated that this genus shown multidrug resistance *in vitro*, but this is not predictive of optima therapy since there are reports of successful treatment with antifungal drugs (Yangco et al., 1984; Bauer et al., 1997; Valle et al., 2001; Hawkins et al., 2006; Fischer et al., 2008; Bento et al., 2010; Choon et al., 2012) for which the clinical isolates demonstrated resistance *in vitro* to several antimicrobials.

This study represents the first *C. lamprauges* assessment of *in vitro* susceptibility to SMX and TMP as well as its synergistic interactions. Previously works demonstrate that preventive and therapeutic potential *in vitro* or *in vivo* of SMX-TMP, alone or associated with antifungal drugs, for other fungi, such as *Pneumocystis* spp. (Utili et al., 2007), *Aspergillus* spp. and *Cryptococcus* spp. (Hanafy et al., 2007), suggesting that these drugs may also have been potential for the treatment of conidiobolomycosis.

In conclusion, the *in vitro* data reported here suggest that the association SMX + TMP and TRB alone or associated with azole antifungal drugs deserve attention as candidates for the treatment of conidiobolomycosis infections. Therefore, additional *in vitro* and *in vivo* studies with a large number of clinical isolates and antimicrobial combinations are needed for a better understanding of the susceptibility of *C. lamprauges* to the antimicrobials described in this study.

References

- al-Hajjar, S., Perfect, J., Hashem, F., Tufenkeji, H. & Kayes, S. (1996) Orbitofascial conidiobolomycosis in a child. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **15**, 1130-1132.
- Bauer, R.W., Lemarie, S.L. & Roy, A.F. (1997) Oral conidiobolomycosis in a dog. *Veterinary Dermatology*, **8**, 115-120.
- Bento, D.P., Tavares, R., Martins Mda, L., Faria, N., Maduro, A.P., Araujo, C., Ventura, F. & Mansinho, K. (2010) Atypical presentation of entomophthoromycosis caused by *Conidiobolus coronatus*. *Medical Mycology*, **48**, 1099-1104.
- Chengappa, M.M. & Pohlman, L.M. (2013). *Agents of Systemic Mycoses*. In Agents of Systemic Mycoses. 3rd edn. Eds McVey, D.S., Kennedy, M. & Chengappa, M.M. pp. 332-343. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- Choon, S.E., Kang, J., Neafie, R.C., Ragsdale, B., Klassen-Fischer, M. & Carlson, J.A. (2012) Conidiobolomycosis in a young malaysian woman showing chronic localized fibrosing leukocytoclastic vasculitis: a case report and meta-analysis focusing on clinicopathologic and therapeutic correlations with outcome. *American Journal of Dermatopathology*, **34**, 511-522.
- Chowdhary, A., Randhawa, H.S., Khan, Z.U., Ahmad, S., Khanna, G., Gupta, R., Chakravarti, A. & Roy, P. (2010) Rhinoentomophthoromycosis due to *Conidiobolus coronatus*. A case report and an overview of the disease in India. *Medical Mycology*, **48**, 870-879.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- de Paula, D.A.J., De Oliveira, J.X., da Silva, M.C., Colodel, E.M., Broetto, L., Pinto, P.M., Schrank, A., Nakazato, L. & Dutra, V. (2010) Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **22**, 274-277.
- Fischer, N., Ruef, C., Ebner, C. & Bachli, E.B. (2008) Rhinofacial *Conidiobolus coronatus* infection presenting with nasal enlargement. *Infection*, **36**, 594-596.

- Furlan, F.H., Lucioli, J., Veronezi, L.O., Fonteque, J.H., Traverso, S.D., Nakazato, L. & Gava, A. (2010) Conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges* in sheep in the state of Santa Catarina, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **30**, 529-532.
- Guarro, J., Aguilar, C. & Pujol, I. (1999) *In vitro* antifungal susceptibilities of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* spp. strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **44**, 557-560.
- Gugnani, H.C. (1992) Entomophthoromycosis due to *Conidiobolus*. *European Journal of Epidemiology*, **8**, 391-396.
- Hanafy, A., Uno, J., Mitani, H., Kang, Y. & Mikami, Y. (2007) *In vitro* antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, **48**, 47-50.
- Hawkins, E.C., Grooters, A.M., Cowgill, E.S., Proulx, D.R., Davainis, G.M., Ruslander, D.M. & Grindem, C.B. (2006) Treatment of *Conidiobolus* sp. pneumonia with itraconazole in a dog receiving immunosuppressive therapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **20**, 1479-1482.
- Humber, R.A., Brown, C.C. & Kornegay, R.W. (1989) Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges*. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 573-576.
- Kimura, M., Yaguchi, T., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Thompson, E.H. & Wickes, B.L. (2011) Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprauges*. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 752-756.
- Korenek, N.L., Legendre, A.M., Andrews, F.M., Blackford, J.T., Wan, P.Y., Breider, M.A. & Rinaldi, M.G. (1994) Treatment of mycotic rhinitis with itraconazole in three horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **8**, 224-227.
- Moody, J. (2007). *Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods*. In Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. 2nd edn. Eds Garcia, L.S. & Isenberg, H.D. pp. 1-23. ASM Press, Washington, DC.

- Morris, M., Ngeleka, M., Adogwa, A.O., Lalla, G., St-Germain, G. & Higgins, R. (2001) Rhinocerebral zygomycosis in a sheep. *The Canadian Veterinary Journal*, **42**, 227-228.
- Oberdorfer, P., Phloenchaiwanit, P., Kongthavonsakul, K. & Chaiwun, B. (2012) Subcutaneous entomophthoramycosis in a healthy 9-year-old boy. *Chiang Mai Medical Journal*, **51**, 125-129.
- Prabhu, R.M. & Patel, R. (2004) Mucormycosis and entomophthoramycosis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, **10 Suppl 1**, 31-47.
- Reiss, E., Shadomy, H.J. & Lyon, G.M. (2012). *Entomophthoramycosis caused by Conidiobolus species*. In Entomophthoramycosis caused by *Conidiobolus* species Eds Reiss, E., Shadomy, H.J. & Lyon, G.M. pp. 467-474. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
- Ribes, J.A., Vanover-Sams, C.L. & Baker, D.J. (2000) Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, **13**, 236-301.
- Roy, A.D. & Cameron, H.M. (1972) Rhinophycomycosis entomophthorae occurring in a chimpanzee in the wild in East Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **21**, 234-237.
- Samanta, I. (2015). *Emerging and Uncommon Pathogenic Fungi*. In Emerging and Uncommon Pathogenic Fungi Ed Samanta, I. pp. 132-154. Springer Berlin Heidelberg, New York, NY.
- Taylor, G.D., Sekhon, A.S., Tyrrell, D.L.J. & Goldsand, G. (1987) Rhinofacial zygomycosis caused by *Conidiobolus coronatus*: a case report including *in vitro* sensitivity to antimycotic agents. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **36**, 398-401.
- Temple, M.E., Brady, M.T., Koranyi, K.I. & Nahata, M.C. (2001) Periorbital cellulitis secondary to *Conidiobolus incongruus*. *Pharmacotherapy*, **21**, 351-354.

- Tondolo, J.S., de Loreto, E.S., Dutra, V., Nakazato, L., de Paula, D.A., Zanette, R.A., Alves, S.H. & Santurio, J.M. (2013) *In vitro* susceptibility of *Conidiobolus lamprauges* recovered from sheep to antifungal agents. *Veterinary Microbiology*, **166**, 690-693.
- Utili, R., Durante-Mangoni, E., Basilico, C., Mattei, A., Ragone, E. & Grossi, P. (2007) Efficacy of caspofungin addition to trimethoprim-sulfamethoxazole treatment for severe pneumocystis pneumonia in solid organ transplant recipients. *Transplantation*, **84**, 685-688.
- Valle, A.C., Wanke, B., Lazera, M.S., Monteiro, P.C. & Viegas, M.L. (2001) Entomophthoramycosis by *Conidiobolus coronatus*. Report of a case successfully treated with the combination of itraconazole and fluconazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **43**, 233-236.
- Walsh, T.J., Renshaw, G., Andrews, J., Kwonchung, J., Cunnion, R.C., Pass, H.I., Taubenberger, J., Wilson, W. & Pizzo, P.A. (1994) Invasive zygomycosis due to *Conidiobolus incongruus*. *Clinical Infectious Diseases*, **19**, 423-430.
- Wuppenhorst, N., Lee, M.K., Rappold, E., Kayser, G., Beckervordersandforth, J., de With, K. & Serr, A. (2010) Rhino-orbitocerebral zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus* in an immunocompromised patient in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**, 4322-4325.
- Yang, X., Li, Y., Zhou, X., Wang, Y., Geng, S., Liu, H., Yang, Q., Lu, X., Hiruma, M., Sugita, T., Ikeda, S. & Ogawa, H. (2010) Rhinofacial conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a Chinese rice farmer. *Mycoses*, **53**, 369-373.
- Yangco, B.G., Okafor, J.I. & TeStrake, D. (1984) In vitro susceptibilities of human and wild-type isolates of Basidiobolus and Conidiobolus species. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**, 413-416.

Table 1 – Combination of sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), amphotericin B (AMB), anidulafungin (ANI), caspofungin (CAS), micafungin (MFG), miconazole (MON), posaconazole (POS), voriconazole (VOR) and terbinafine (TRB) against seven *Conidiobolus lamprae* strains.

Combination (Drug 1 + Drug 2)	Drugs in combination		FICI		Interpretation (%)	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		FICI Range (GM)	Syn		
	Range (GM)	Drug 2				
SMX + TMP	Drug(s) 1 4 - 8 (5.94)	Drug 2 8 - 32 (23.78)	0.18 - 0.37 (0.31)	100	0	
SMX/TMP + AMB	0.25/1 - 8/32 (0.41/1.64)	1 - 2 (1.22)	1.03 - 3.00 (1.21)	0	100	
SMX/TMP + ANI	8/32 - 16/64 (9.75/39)	0.06 - 4 (0.11)	1.00 - 2.00 (1.64)	0	100	
SMX/TMP + CAS	4/16 - 16/64 (9.75/39)	0.125 - 16 (0.45)	1.01 - 2.01 (1.64)	0	100	
SMX/TMP + MFG	0.25/1 - 16/64 (2.44/9.76)	0.06 - 64 (8.73)	0.53 - 2.50 (1.24)	0	100	
SMX/TMP + MON	0.25/1 - 0.5/2 (0.28/1.12)	4 - 16 (7.25)	0.56 - 2.03 (1.06)	0	100	
SMX/TMP + POS	4/16 - 8/32 (5.38/21.52)	0.003 - 0.03 (0.01)	0.51 - 1.00 (0.91)	0	100	
SMX/TMP + VOR	4/16 - 8/32 (7.25/29)	0.015 - 4 (0.15)	0.51 - 2.00 (1.22)	0	100	
SMX/TMP + TRB	0.25/1 - 4/16 (0.37/1.48)	0.25 - 4 (1.49)	0.53 - 1.25 (0.89)	0	100	
TRB + AMB	0.06 - 4 (0.3)	0.003 - 2 (0.09)	1.00 - 1.03 (1.02)	0	100	
TRB + ANI	0.5 - 4 (1.81)	0.06 - 1 (0.13)	0.51 - 1.00 (0.82)	0	100	
TRB + CAS	1 - 2 (1.81)	0.125 - 4 (0.25)	0.51 - 1.01 (0.82)	0	100	
TRB + MFG	0.06 - 2 (0.55)	8 - 64 (26.25)	0.37 - 0.75 (0.56)	29	71	
TRB + MON	0.06 - 1 (0.33)	0.06 - 8 (0.9)	0.15 - 1.03 (0.42)	71	29	
TRB + POS	0.06 - 4 (0.5)	0.003 - 4 (0.01)	0.07 - 1.00 (0.29)	71	29	
TRB + VOR	0.25 - 2 (0.61)	0.015 - 0.5 (0.07)	0.12 - 1.00 (0.28)	71	29	

MIC, minimum inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index; GM, geometric mean; S, synergism; I, indifference

**4 ARTIGO 2 - A SIMPLE, RAPID AND INEXPENSIVE SCREENING METHOD FOR
THE IDENTIFICATION OF *PYTHIUM INSIDIOSUM***

Artigo no formato *Short Communication* publicado no periódico
Journal of Microbiological Methods
(ISSN: 0167-7012)



Note

A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*[☆]

Juliana Simoni Moraes Tondolo^a, Érico Silva Loreto^a, Laura Bedin Denardi^b, Débora Alves Nunes Mario^b, Sydney Hartz Alves^b, Janio Morais Santurio^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima no. 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria – CEP 97105-900, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2012

Received in revised form 5 February 2013

Accepted 8 February 2013

Available online 16 February 2013

Keywords:

Laboratory identification

Minocycline

Pythiosis

ABSTRACT

Growth of *Pythium insidiosum* mycelia around minocycline disks (30 µg) did not occur within 7 days of incubation at 35 °C when the isolates were grown on Sabouraud, corn meal, Muller-Hinton or RPMI agar. This technique offers a simple and rapid method for the differentiation of *P. insidiosum* from true filamentous fungi.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Pythiosis is a chronic pyogranulomatous disease caused by the oomycetous *Pythium insidiosum*, a fungus-like aquatic organism that inhabits swampy areas (Mendoza et al., 1993). *P. insidiosum* causes infections in humans and animals, especially horses, dogs, cattle, cats and sheep (Gaastra et al., 2010). Although antifungal and antibacterial drugs have inhibited the growth of *P. insidiosum* in vitro (Cavalheiro et al., 2009; Loreto et al., 2011), treatment with these antimicrobial agents remains contradictory (Salipante et al., 2012; Schloemer et al., 2012; Shenep et al., 1998), and the combination of surgical treatment with antimicrobial agents or immunotherapy has been described in cases of therapeutic cure (Sudjaritruk and Sirisantha, 2011; Wanachiwanawin et al., 2004).

Successful treatment of pythiosis is directly associated with the progression of the disease, with the organ or region involved and especially with the early identification of the agent (Gaastra et al., 2010). *P. insidiosum* can be recovered from the affected tissue and *kunkers* and can be grown on traditional culture media, such as Sabouraud dextrose agar (SDA) or corn meal agar (CMA) (Groote et al., 2002); the mycelia grow quickly on these media, usually filling the culture plate in less than five days with whitish, submerged colonies composed of hyaline hyphae without fruiting bodies. These features of

the culture, which are associated with the visualization of broad, sparsely septate hyphae in the histopathological analysis, often lead to the suspicion of pathogens of the fungal orders Mucorales and Entomophthorales, causing a delay in the correct characterization of *P. insidiosum* (Kaufman, 1998; Mendoza et al., 2004).

The identification of *Pythium* species is based on the morphological and physiological characteristics of their reproductive structures (zoospores, oogonia and antheridia), but cases of pythiosis are usually confirmed by serologic and molecular tests (Gaastra et al., 2010; Salipante et al., 2012). Recently, Loreto et al. (2011) described the chemotherapeutic potential of minocycline and other antibiotics against isolates of *P. insidiosum* through a broth microdilution susceptibility test. In a new approach, the aim of this study was to evaluate the use of a disk diffusion technique with minocycline as a screening method for the identification of *P. insidiosum* as well as their differentiation from true fungi.

Thirty-eight clinical *P. insidiosum* isolates from equine pythiosis cases and the reference strains ATCC 58.637 and CBS 101.555 were utilized. All of the clinical isolates were previously identified by PCR according to the method of Botton et al. (2011). *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *A. parasiticus* NRRL 2999, *Basidiobolus ranarum* CBS 538.63, *Fusarium solani* ATCC 36031, *Absidia* spp. (n = 1), *Cunninghamella* spp. (n = 1), *Mucor indicus* (n = 1), *Rhizopus* spp. (n = 1), *Syncephalastrum* spp. (n = 1), *Conidiobolus lampragues* (n = 6), *Aspergillus flavus* (n = 1), *Aspergillus carbonarius* (n = 1), *Acromonium killensis* (n = 1) and *Penicillium marneffei* (n = 1) were included as control strains. Initially, all of the isolates were grown on SDA (Himedia®), CMA (Himedia®), Mueller-Hinton agar (MHA, Himedia®) or RPMI-1640 agar with

[☆] These results were partially presented in poster form at the 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology in June 2012.

* Corresponding author. Tel./fax: +55 55 3220 8906.

E-mail addresses: jutondolo@yahoo.com.br (J.S.M. Tondolo), erico.loreto@gmail.com (É.S. Loreto), laura-denardi@hotmail.com (L.B. Denardi), debara_alves6@hotmail.com (D.A.N. Mario), sydneyalves.ufsm@gmail.com (S.H. Alves), janio.santurio@gmail.com (J.M. Santurio).

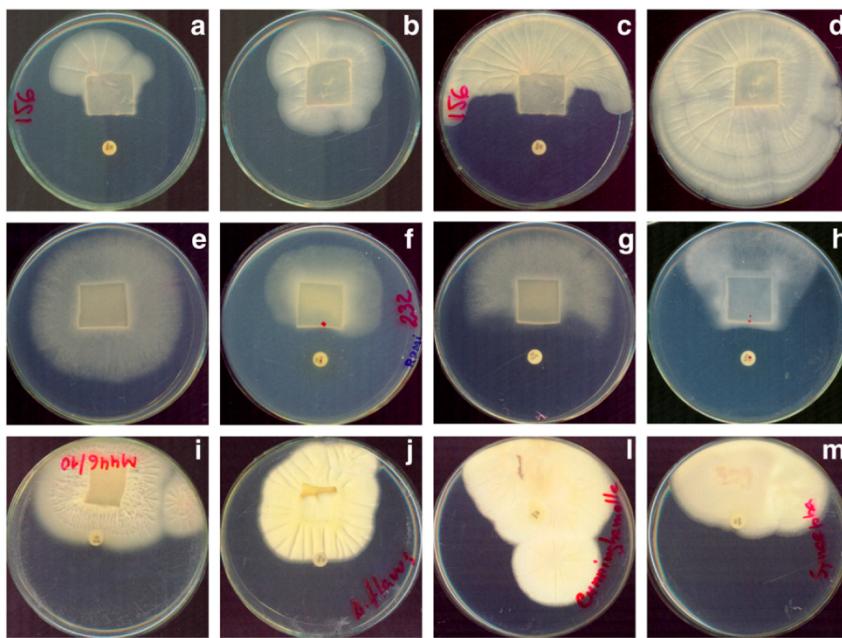


Fig. 1. Bottom side of plates (reverse) showing the effect of minocycline disk (30 µg) on the growth of *Pythium insidiosum* after 48 h at 35 °C (a, f and g) on Sabouraud dextrose agar (SDA), RPMI agar and Muller-Hinton agar (MH), respectively. Growth of *P. insidiosum* mycelia over the minocycline disks did not occur, even after prolonged incubation (c, SDA – 5 days; h, corn meal agar – 72 h). On the control plates, *P. insidiosum* grew actively after 48 h (b, SDA and e, MH) and five days (d, SDA) of incubation at 35 °C. The true fungi control strains grew over the minocycline disks as shown in (i) *Conidiobolus lampragues*, (j) *Aspergillus flavus*, (l) *Cunninghamamella* spp. and (m) *Syncophaulastrum* spp. after 48–72 h at 35 °C.

L-glutamine buffered to pH 7.0 with MOPS (RPMI, Sigma-Aldrich®) and incubated at 35 °C for 48–96 h. Agar blocks from the margin of an actively growing *P. insidiosum* culture measuring approximately 2×2 cm per isolate were aseptically cut and subcultured in a new plate (90 mm) containing the same medium as the previous culture. One of the edges of each block was placed in the center of the plate, and a paper disk (CEFAR®) containing 30 µg of minocycline was placed 1.5 cm from this edge. Control plates that did not contain minocycline disks were included for each isolate. The tests and controls were incubated at 35 °C and analyzed every 24 h for seven days. Inter-assay analyses were performed on three different days. The presence of a growth inhibition zone between the *P. insidiosum* colony and the minocycline disk was taken as a positive result.

On the control plates, *P. insidiosum* grew actively and colonized the entire agar surface within 3 to 7 days of inoculation for all culture media (Fig. 1b, d and e). In the test cultures, contact between the *P. insidiosum* mycelia with the minocycline disks did not occur within 7 days of inoculation, and hyphal growth was observed in the opposite direction from the disk (Fig. 1a, c, f, g and h). Within 24–48 h of inoculation, hyphal growth ceased between the *P. insidiosum* colony and the minocycline disk for all 40 isolates (100%) on SDA, CMA, MHA and RPMI-1640. All the true fungi control strains grew over the entire culture dish, and no growth inhibition was observed in the mycelia around the minocycline disks.

The present study explored, for the first time, the potential use of a simple disk diffusion method as a tool to identify *P. insidiosum* from cases of equine pythiosis. Because the growth of true fungi is not inhibited by the presence of a minocycline disk in the culture medium, the technique proposed here can differentiate *P. insidiosum* from true fungi.

SDA and CMA culture media are frequently used in microbiology laboratories, and MHA and RPMI are commonly selected for disk diffusion tests and Etests, respectively. Minocycline disks can be purchased commercially and are routinely used for antimicrobial susceptibility

testing for bacteria. In this context, this technique can be easily applied. Is worth noting that the presence of a minocycline disk can completely inhibit the growth of *P. insidiosum* hyphae when it is less than 3 cm away from the colony (data not shown), which emphasizes the need for control plates.

This disk diffusion technique is an inexpensive, simple and rapid screening method for the differentiation of *P. insidiosum* from true fungi. The use of blocks of agar containing the mycelia of *P. insidiosum* allows this technique to be applied from the primary culture, without the need to prepare the inoculum from the zoosporeogenesis technique. Further studies including a larger number of isolates recovered from human and other animal cases of pythiosis are needed to confirm the present results. Finally, it is recommended that the diagnosis of pythiosis be confirmed by histopathological and serological tests. The definitive identification of *P. insidiosum* still requires genotyping techniques.

Acknowledgments

We thank the Brazilian agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their support. Érico Silva Loreto is the recipient of a PNPD-CAPES fellowship. We thank Prof. Valéria Dutra for providing *Conidiobolus lampragues* strains.

References

- Botton, S.A., Pereira, D.I.B., Costa, M.M., Azevedo, M.I., Argenta, J.S., Jesus, F.P.K., et al., 2011. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. *Curr. Microbiol.* 62, 1225–1229.
- Cavalheiro, A.S., Maboni, G., de Azevedo, M.I., Argenta, J.S., Pereira, D.I.B., Spader, T.B., et al., 2009. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2136–2138.
- Gaastra, W., Lipman, L.J.A., De Cock, A.W.A.M., Exel, T.K., Pegge, R.B.G., Scheurwater, J., et al., 2010. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet. Microbiol.* 146, 1–16.

- Grooters, A.M., Whittington, A., Lopez, M.K., Boroughs, M.N., Roy, A.E., 2002. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 288–294.
- Kaufman, L., 1998. *Penicilliosis marneffei* and pythiosis: emerging tropical diseases. *Mycopathologia* 143, 3–7.
- Loreto, E.S., Mario, D.A.N., Denardi, L.B., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2011. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3588–3590.
- Mendoza, L., Hernandez, F., Ajello, L., 1993. Life cycle of the human and animal Oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2967–2973.
- Mendoza, L., Prasla, S.H., Ajello, L., 2004. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. *Mycoses* 47, 14–23.
- Salipante, S.J., Hoogestraat, D.R., Sengupta, D.J., Murphey, D., Panayides, K., Hamilton, E., et al., 2012. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection using PCR screening and DNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1480–1483.
- Schloemer, N.J., Lincoln, A.H., Mikhailov, T.A., Collins, C.L., Di Rocco, J.R., Kehl, S.C., et al., 2012. Fatal disseminated *Pythium insidiosum* infection in a child with Diamond-Blackfan anemia. *Infect. Dis. Clin. Pract.* <http://dx.doi.org/10.1097/IPC.1090b1013e318278f318273b318275> (Publish Ahead of Print).
- Shenep, J.L., English, B.K., Kaufman, L., Pearson, T.A., Thompson, J.W., Kaufman, R.A., et al., 1998. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clin. Infect. Dis.* 27, 1388–1393.
- Sudjaritruk, T., Sirisanthana, V., 2011. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. *BMC Infect. Dis.* 11, 1–4.
- Wanachiwanawin, W., Mendoza, L., Visuthisakchai, S., Mutsikapan, P., Sathapatayavongs, B., Chaiprasert, A., et al., 2004. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine* 22, 3613–3621.

5 MANUSCRITO 2 – EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF A *PYTHIUM INSIDIOSUM*-DERIVED β -GLUCAN AND ITS IMMUNOMODULATORY ACTIVITY ON LYMPHOCYTE PROLIFERATION AND IN MICE IMMUNIZATION

Artigo no formato *Original full-length research paper* para submissão ao periódico
Carbohydrate Polymers
(ISSN: 0144-8617)

Title: Extraction and characterization of a *Pythium insidiosum*-derived β -glucan and its immunomodulatory activity on *in vitro* lymphocyte proliferation and *in vivo* mice immunization

Authors: Juliana S. M. Tondolo¹, Pauline C. Ledur¹, Érico S. Loreto¹, Camila M. Verdi¹, Paula E. Bitencourt², Jean P. Rocha¹, Sydney H. Alves², Guilherme L. Sasaki³, Janio M. Santurio¹

Affiliations

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

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

³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, PR, Brazil

Address for correspondence:

Janio Moraes Santurio

Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Phone/Fax: +55 55 32208906. E-mail: janio.santurio@gmail.com

Abstract

We, firstly, performed an enzymatic glucan quantification of the *P. insidiosum* mycelia that showed a content (%w/w, mean \pm SD) of total glucan 23.09% \pm 3,71, α -glucan 4.10% \pm 0,83 and β -glucan 18.99% \pm 3.59. Following, were performed procedures to extraction, structural characterization and biological activity of a β -glucan from *P. insidiosum*-cell wall. The polysaccharide extract showed ~81.7% of carbohydrate (exclusively glucose) and ~18.3% of residual amino acids and peptides. Results from monosaccharide composition, methylation analysis and 2D NMR spectroscopy indicated a branched (1,3)(1,6)- β -D-glucan. *In vitro*, the effects of β -D-glucan extract on equine, human and mice lymphocytes proliferation showed that β -D-glucan could significantly promote spleen lymphocytes proliferation. For *in vivo* tests, cytokine measurement of cultured spleen cells from BALB/c mice pre-immunized subcutaneously three times with 0.5, 2.5 and 5.0 mg β -glucan/mouse, showed a significant increase on IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α and IL-17A production compared to non-immunized mice (control group). These results suggested that β -D-glucan extract induces significant and specific Th17 type cellular immune responses and provided theoretical basis for further experiment.

Keywords: pythiosis, fungal infection, cytokines, β -glucan

Introduction

Pythium insidiosum is an oomycete, a fungus-like aquatic organism that inhabits swampy areas, and causes infections in human and animals, especially horses (Gaastra et al., 2010). Pythiosis has been reported in tropical and subtropical areas, progresses rapidly and if not treated in the early stages of the disease through surgical excision, antimicrobial and/or immunotherapy, can be fatal in a few weeks (Santurio, Alves, Pereira & Argenta, 2006). In Brazil, most of the cases of equine pythiosis which are treated with PitiumVac®, an immunotherapeutic prepared from the mycelial mass of *P. insidiosum*, reached a rate of cure between 70-80% (Moraes et al., 2013). However, this therapeutic approach provides a curative but not a protective response, since reinfections were reported (Santos, Marques, Zanette, Jesus & Santurio, 2011).

The oomycetes and true fungi can be distinguished biochemically by differences in cell wall composition. Unlike fungi that contain chitin as a main structural constituent, the oomycetes have a small amount of this carbohydrate (<1%), containing cellulose and a high concentration of other polysaccharides, particularly β -glucans (Aronson, Cooper & Fuller, 1967; Bartnicki-Garcia, 1968). Since the main components of the cell wall and capsules of fungi are polysaccharides, they have become an important target for research (Astronomo & Burton, 2010). Indeed, β -glucans from fungi and yeast are well-known biologic response modifiers that function as immunostimulants against infectious disease and cancer (Chen & Seviour, 2007; Vetzicka, 2011), they are essential for the pathogenic mechanisms of the microorganisms and also to trigger the immune response of the host during a fungal infection (Romani, 2011).

Different kinds of response could be initiated after the host-pathogen interaction. A dominant Th1 cell response is thought to be essential for protective immunity against pathogenic fungi and effective fungal vaccine. IFN- γ , the signature cytokine of antigen-specific Th1 cells, activates phagocytes to kill fungi at the sites of infection (Romani, 2011). Th2 cell

responses are associated with severe disease and disease relapse, supported mainly by IL-4 that dampening the protective Th1 response and favor fungal infections (van de Veerdonk & Netea, 2010). Th17 cells are present in the fungus-specific T cell memory repertory in humans, mediate vaccine-induced protection in mice, and are distinguished by the production of IL-17A (Bar, Whitney, Moor, Sousa & LeibundGut-Landmann, 2014). The fine balance between the different kinds of T cell response will determine the outcome of infection (van de Veerdonk & Netea, 2010).

In this context, the objective of our work was to gain further insight into the quantification and extraction of cell wall β -glucans from *P. insidiosum* once it is still unknown. After that, we analyzed the structure of these β -glucan and tested the ability of *in vitro* immunostimulation on human, equine and mice lymphocytes by MTT methods. In immune response test, healthy mice were injected with different concentrations of the β -glucans extract, and the profile of Th1/Th2/Th17 cytokines was accessed by flow cytometry.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture conditions

Thirteen *P. insidiosum* strains isolated from equine pythiosis lesions were used for the determination of glucans content. All of the isolates were previously identified by a nested PCR-based assay according to Botton et al. (2011). The reference strains included *P. insidiosum* ATCC 58.637 and *P. insidiosum* CBS 101555 from equine pythiosis cases and *P. aphanidermatum* CBS 128995 from a human pythiosis case. Initially, strains were grown on corn meal agar (CMA, Himedia[®]) supplemented with yeast extract (Himedia[®]) (4 g/L), K₂HPO₄ (Vetec[®]) (1.0 g/L) and KH₂PO₄ (Vetec[®]) (0.6 g/L), pH adjusted to 7.0 ± 0.1, at 37°C for 48 h. After the primary culture, slices of mycelia (1 cm²) were transferred to 150 mL culture broth in 250 ml Erlenmeyer flasks that contained: peptone (Himedia[®]) (10 g/L), D-(+)-glucose (Vetec[®])

(20 g/L), yeast extract (4 g/L), K₂HPO₄ (2.5 g/L), KH₂PO₄ (1.5 g/L), pH adjusted to 7.0 ± 0.1.

The flasks were incubated at 37°C in an orbital shaker (Tecnal, TE-420) at 120 rpm for 7 days.

After that, mycelium was inactivated with 0.02% of thimerosal (Sigma-Aldrich®) followed by freezing for 24 h and then, the supernatant was discarded and the mycelia were washed with sterile distilled water until the supernatant became clear and filtered on vacuum. Extraction and characterization of β-glucans were performed using the *P. insidiosum* Pi-135 isolate, for which the nucleotide sequence data were deposited in GenBank under accession number KJ133548.

2.2. Cell wall β-glucans

2.2.1. The mycelia glucans content

The filtered mycelia from cultured *P. insidiosum* strains were dried until constant weight at 50 °C. A pestle and a mortar were used to disrupt the cells and turn the mass of cultured *P. insidiosum* mycelia into a powder that was passed through a sieve (0.5 mm). The quantification of the glucans content (total, α and β-glucans) was determined enzymatically using a β-glucan assay kit (Megazyme®), according to the manufacturer's instructions and performed in duplicate.

2.2.2. Extraction of mycelia β-glucans

The extraction was done according to Liu, Wang, Cui and Liu (2008) with some modifications. The mycelium was suspended in distilled water (adjusted to 15% w/w solids content and pH 5.0) added of 3% sodium chloride (Vetec®) as the autolysis promoter and then incubated in an orbital shaker at 55°C for 24 h with agitation at 120 rpm. The autolysate was then heated at 80°C for 15 min, cooled to room temperature and centrifuged at 4400 rpm (IEC, Centra MP4R) for 10 min to separate the residual autolyzed mycelia. About 250 mL suspension of autolyzed mycelia adjusted to 10% w/w solids content in 0.02M sodium phosphate buffer,

pH 7.5, was heated to 121°C in an autoclave for 4 h, cooled to 45°C and the insoluble residues were separated and washed twice with distilled water. After the hot-water treatment, the micelium was suspended in distilled water to obtain a suspension containing 15% solids content, and then, was homogenized by a portable homogenizer (Scilogex® D-500) at the maximum speeds (29000 rpm) for 15 min. This cell suspension was washed with distilled water until the supernatant became clear, and then, the homogenized cell walls were obtained. The cell walls were suspended in isopropyl alcohol (Vetec®) 1:4 (w/v), heated under reflux for 2 h, and the mixture was centrifuged at 4400 rpm for 10 min after cooled down to 30°C. The residues were washed with acetone (Vetec®) according to a ratio of 1:1 (w/v) for three times. Following, the sediments were diluted with distilled water adjusted to 15% (w/w), and Protamex® (Sigma-Aldrich®) was added at 20 mg/g in condition of pH 7.5, temperature at 55 °C for 5 h. After enzymatic hydrolysis, the suspension was heated at 80 °C for 15 min, and the insoluble residues were separated by centrifugation at 4400 rpm for 10 min at room temperature and washed several times with cold distilled water until the supernatant did not contain any soluble protein detected by Bradford method (Bradford, 1976). The supernatant was discarded and the wet β-D-glucans were frozen to -80 °C and lyophilized (Jouan LP3®). The obtained extract was analyzed for glucans content with Megazyme assay and chemical analysis were done to characterize the glucan composition and structure.

2.2.3. Chemical analysis

2.2.3.1. Monosaccharide composition by NMR

The polysaccharide extract (5mg) was hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid (200 µL) at 100 °C for 8 h in reinforced 4-mL Pyrex tubes with Teflon-lined screw cap vessel. After evaporation to dryness under N₂ pressure the residue was dissolved in 0.5 mL of D₂O. Presaturation of residual HDO was performed with the pulse program zgpr, using a relaxation

delay = 5.0 s, number of time domain points = 65536, and acquisition time = 2.7 s to obtain a spectrum width of 10 ppm, using 16 scans to give a signal/noise (S/N) ratio of at least 1000:1. Integration of hydrogen areas of monosaccharides and amino-acids/peptide region were performed without tube spinning and respecting an HDO signal with a medium half line width varying from 1.0-1.2 Hz. The identification of monosaccharide was based on the chemical shifts obtained from a standard mixture containing 5 mM of all 18 monosaccharides (Sassaki et al., 2014).

2.2.3.2. Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis

An aliquot of 100 mg of freeze dry material was extracted 4 mL of Dimethyl sulfoxide (DMSO) for 24 h at 70 °C. The extract suspension was centrifuged at 10.000 rpm for 5 min, at 20 °C. The DMSO solution was frozen dried, giving DMSO-Soluble polyssacharides (DSpol 15 mg), the remaining insoluble material was recovered and stored at –20 °C.

DSpol (15 mg) was dissolved in 0.5 mL of DMSO-d₆. The nuclear magnetic resonance spectra were obtained using a Bruker Avance III 14.1 T spectrometer equipped with an inverse 5-mm pentanuclear resonance probe head (QXI) at 343 K. 1D ¹H-NMR at 600 MHz were performed after 90 ° (p1) pulse calibration at 10.93 µs. ¹H and ¹³C chemical shifts were determined by 2D COSY (homonuclear) and HSQC (heteronuclear) experiments. The latter were carried out by correlation via double inept transfer with decoupling during acquisition, using sensitivity improvement trim pulses in inept transfer and shaped pulses for all 180 degree pulses on the ¹³C channel, compiled in the pulse program hsqcedetgpsisp2.2, using 6993 Hz (¹H) and 24900 Hz (¹³C) widths, and a recycle delay of 1.080 s. The spectra were recorded for quadrature detection in the indirect dimension, using 32 scans per series of 1024 x 256 data points with zero filling in F1 (2048) prior to Fourier transformation (Sassaki et al., 2013).

2.2.3.3. Methylation analysis of polysaccharides

Methylation of DSpol was carried out using NaOH-Me₂SO-MeI (Ciucanu & Kerek, 1984) 1.0 mg of polysaccharide was solubilized in Me₂SO (250 µL), followed by addition of fresh pulverized NaOH (10 mg) and vortexed for 10 min. Into the mixture, MeI (500 µL) was added and vigorously shaken for 30 min, neutralized with HOAc and the sample was extracted with CHCl₃ and methylation was completed. Per-*O*-methylated polysaccharide was hydrolyzed with 45% aqueous formic acid (HCO₂H, 1,0 mL) for 26h at 100°C. The sample in 200 µL of water was reduced with NaB²H₄ (2.0 mg), and, after 12 h, 2M TFA (100 µL) and the solution evaporated to dryness, and the resulting boric acid removed as trimethyl borate by co-evaporation with MeOH. Acetylation was carried out with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v; 200 µL) at 100°C for 1 h. An excess of ice-water was added to the solution and the resulting Per-*O*-methylated alditol acetate derivatives (PMAA) were extracted with CHCl₃. The samples were analysed by GC-MS (Varian-Saturn 4000-3800 gas chromatograph coupled to a Varian Ion-Trap 4000 mass spectrometer) using a VF-5MS column (30 m 0.25 mm) programmed from 50 to 220 °C at 40 °C/min, and helium was used as the carrier gas. Partially O-methylated alditol acetates were identified from m/z of their positive ions, by comparison with standards, the results being expressed as a relative percentage of each component (Sassaki, Gorin, Souza, Czelusniak & Iacomini, 2005).

2.4. The design of experiment *in vitro*

2.4.1. Isolation of lymphocytes

Equine and human lymphocytes were isolated from peripheral blood of a healthy donor by density gradient centrifugation using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich®). Briefly, after centrifugation, the cell pellet was washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7.4 and resuspended in a complete tissue culture medium [CTCM: RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®), 10%

fetal bovine serum (Vitrocell®), penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich® - 100 U and 100 µg/mL, respectively)]. Lymphocytes from mouse were isolated from the spleen of the control group used in the *in vivo* experiment, which was removed aseptically, minced and passed through a stainless steel mesh to obtain single cell suspensions in phosphate buffer saline (PBS). After the red blood cells were disrupted, the splenocytes were washed twice with PBS, and the resulting pellet was re-suspended and diluted in CTCM. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion, and all lymphocytes suspensions were diluted to 2×10^6 mL⁻¹ in CTCM.

2.4.2. Lymphocyte proliferation assay

The cell suspensions of equine, human and mouse lymphocytes were added to 96-well culture plates, 100 µL per well. Then, β-glucan extract at series of concentrations were added, in RPMI-1640 (cell control group), concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich®) and phytohemagglutinin (PHA, Vitrocell®) (control mitogen groups), 100 µL per well, five wells each concentration. The final concentration of ConA and PHA reached to 5 µg mL⁻¹ and 10 µg mL⁻¹, respectively. The plates were incubated in a humid atmosphere with 5% CO₂ at 37°C for 3 days and then, 20 µL of MTT 5 mg mL⁻¹ (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) was added into each well at 4 h before the end of incubation. The plates were centrifuged at 440 x g for 5 min at room temperature. The supernatant was removed carefully and 200 µL of DMSO was added into each well. The plates were shaken for 5 min to dissolve the crystals completely. The absorbance of cells in each well was measured at 590 nm in a plate reader (Bio-Rad Laboratories®) as the index of lymphocytes proliferation (A₅₉₀ value) (Fan et al., 2012). The experiments were done in five replications and repeated twice.

2.5. The design of experiment *in vivo*

2.5.1. Animals

Female BALB/c mice, 6-8 weeks old, were used in this study ($25.5\text{ g} \pm 3.4$). Animals were housed in groups of five and allowed access to food and water *ad libitum*. All animal experiments were done with the approval of the Institutional Animal Care and Use committee at the Federal University of Santa Maria (number 071/2014).

2.5.2. Immune response test

Twenty mice were randomly divided into 4 groups (n=5). The *P. insidiosum*-derived β -glucan at concentration of 0.5, 2.5, and 5.0 mg/mouse were suspended in sterile distilled water and were administered subcutaneously to mice at the dorsal site (100, 150, and 200 μL , respectively) once a week for 3 weeks. Control group received just 100 μL of sterile distilled water. Two weeks after the last dose, mice were euthanized with isoflurane (Cristalia[®]); spleens were aseptically removed, and lymphocytes isolated as previously described. All lymphocytes suspension were diluted to $2 \times 10^6\text{ mL}^{-1}$ in CTCM and cultured at 5% CO₂, 37°C for 3 days, in triplicate. Cells were re-stimulated with β -glucan solutions at 0.5, 2.5 and 5.0 mg. mL^{-1} according to original groups. The supernatant of spleen cell cultures were stored at -80 °C until analyzed for cytokines content.

2.5.3. Determination of cytokines by flow cytometry

For the cytokine profile, the mouse Th1/Th2/Th17 cytokines Cytometric Bead Array (CBA) kit (BD Biosciences[®]) was used, which measures IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF and IL-17A. Data were acquired on BD AccuriTM C6 (BD Biosciences[®]) flow cytometer. Assay was performed according to the manufacturer's instructions.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.D. Significance was assessed by ANOVA one way followed by Holm-Sidak post-hoc. All analysis were performed on software SigmaPlot[®] version 12.5. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. β -Glucan content in *Pythium* spp. mycelia and extract

Measured values of total glucan, α -glucan and β -glucan from mycelia and glucan extract are given in Table 1. The screening of the thirteen *P. insidiosum* clinical isolates revealed the follow glucan content in the dry mycelium (% w/w, mean \pm SD): 23.06 \pm 3.55 of total glucan, 3.82 \pm 0.91 of α -glucan and 19.24 \pm 3.57 of β -glucan. The reference strains presented similar results, with β -glucan content ranging from 20.81 to 28.85 % w/w. In addition, Glucan extract showed 66.0% of total glucan and 65.81% of β -glucan, respectively.

This is the first work that quantified the glucan content of *P. insidiosum*. Comparison between the glucan content of *P. insidiosum* (\approx 20%) with *Aspergillus candidus* (\approx 3.4%), *Fusarium gramineraum* and *Trichoderma harzianum* (\approx 6%), *Penicillium* and *Paecilomyces* spp (\approx 17-23%) (Kyanko, Canel, Ludemann, Pose & Wagner, 2013) shown a significant amount of this carbohydrate in its composition. Pioneering work on oomycetes revealed that the cell walls of this class of microorganisms consist essentially of 1,3- β - and 1,6- β -glucans (Aronson, Cooper & Fuller, 1967; Novaes-Ledieu & Jimenez-Martinez, 1968). However, the information available is restricted to a limited number of species and based on data obtained from analytical methods with rather poor resolution (Melida, Sandoval-Sierra, Dieguez-Uribeondo & Bulone, 2013).

3.2. Chemical analysis of β -Glucans extract from the *P. insidiosum* cell wall

The monosaccharide composition showed exclusively glucose (Fig. 1). Integration of the ¹H NMR spectrum revealed ~81.7% of carbohydrate and ~18.3% of residual amino acids and peptides which were observed in the aliphatic region and aromatic region (Fig. 1). The glucan was submitted to methylation and NMR analyses. GC-MS analysis of DSpol of PMAA showed 2,3,4,6- Me₄Glc (34%), 2,4,6-Me₃Glc (18%), 2,3,4-Me₃Glc (17%) and 2,4-Me₂Glc (31%), showing the presence of a branched (1,3) β-glucan by side chains of (1,6) β-glucopyranosyl units. Edited HSQC analysis was used to observe the glycosidic configuration and linkage of the glucan, particularly for the signals regarding H1/C1 cross peaks. The anomeric region for the polysaccharide showed characteristic signals with chemical shifts attributed to β-linked Glcp units at δ 102.7/4.53, 103.0/4.27, 102.6/4.36 and 103.5/4.38, corresponding to 3-O-substituted, 6-O-substituted, 3,6-di-O-substituted and non-reducing ends units, respectively (Fig. 2). The presence of signals at δ 86.2/3.49 and 87.3/3.40 arise to substitutions at C-3 of O-3 and di-O-3,6 units. In the negative phase is possible to observe the C-6 substitutions at δ 68.0/4.01, 3.63, which confirm the presence of (1,6)-β-linked units. The combination of the presented data from monosaccharide composition, methylation analysis and 2D NMR spectroscopy suggests that *P. insidiosum* glucan contains a (1,3)-linked, β-D-glucopyranosyl main chain, substituted at O-6 by side chains of β-D-glucopyranosyl units of the backbone on average every 1-2 repeat units, according to methylation and NMR integration of the anomeric areas.

3.3. Effects of β-glucan extract on splenic lymphocyte proliferation

The data of equine lymphocyte proliferation are shown in Fig. 3A. The mitogen PHA and all doses of β-glucan tested promoted significant proliferation compared to the cell control group. With human lymphocyte (Fig. 3B), PHA and all doses of β-glucan tested also promoted significant proliferation compared to the cell control group. In mice spleen cells, the mitogen,

ConA, and β -glucan from 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ promoted significant proliferation compared to the cell control group (Fig. 3C).

Lymphocyte proliferation is the immediate index that reflecting organic immunity. T and B lymphocytes play an important role in enhancing immune function of organism and to determine its changes in proliferation rate is the better method to study the activity and action mechanism of drugs (Fan et al., 2012). We observed that β -glucan significantly stimulated human, mouse and equine lymphocyte proliferation indicating the ability to enhance cellular immunity, and that it displayed no toxicity toward peripheral mononuclear blood cells.

3.4. Effects of β -glucans extract *in vivo* on cytokine profile

To determine whether *in vivo* treatment with β -glucan could modify the cytokine production, we analyze the supernatant of spleen cell's culture. The levels of IL-2, IL-10, IL-17A and TNF- α produced by spleen cells from all β -glucan vaccinated mice were significantly higher than those observed in cultures of cells from the control group. IL6 production was significant higher than the control group in 2.5 and 5.0 β -glucan groups. Significant difference between treatments was observed in IL-6, IL-10 and TNF- α concentration that generally increased with increasing dose. IFN- γ , IL-2 and IL-17A production did not significantly differ between concentrations (Fig. 4). IL-4 production was detected in few samples at very low levels and so that was not described.

Cytokine production by CD4 $^{+}$ helper T lymphocytes during immune response play an important role in regulating the nature of the response (Huang, Ostroff, Lee, Specht & Levitz, 2010). The proposed host immune response to natural *P. insidiosum* infection is a Th2 response with eosinophilic inflammation and release of IL-4 and IL-5 associated to disease progression. A likely explanation for the curative mechanism by which treatment of pythiosis with antigens extracted from *P. insidiosum* culture works is a switch of the Th2 to a Th1 response, producing

high level of IFN- γ and IL-2 (Mendoza & Newton, 2005). Moreover, many fungal infections are predicted to be cured when a Th1 and/or Th17 response is established (Huang, Ostroff, Lee, Specht & Levitz, 2010). Indeed, Wuthrich et al. (2011) showed that vaccine-induced Th17 cells were necessary and sufficient to protect against multiple dimorphic fungi: *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. The experimental results found by us indicated that β -glucan from *P. insidiosum* could promote proliferation and differentiation of Th17 cell, and promote the Th17-mediated cellular immunity.

β -glucans are a basis of fungal cell wall structure. They are not found in animals, so that as carbohydrates they can be recognized by the innate immune system of vertebrates (Brown & Gordon, 2005). *In vitro* experiments showed that β -glucans can directly activate leukocytes, stimulating their phagocytic, cytotoxic, and antimicrobial activity (Vetvicka, 2011). Recent works using a *Saccharomyces cerevisiae*-derived whole glucan particle demonstrated its potential as vaccines against coccidioidomycosis and aspergillosis (Clemons et al., 2015; Clemons et al., 2014). In addition, they have anti-tumor (Qi et al., 2011), anti-oxidative (Ceyhan et al., 2012), anti-inflammatory (Du, Lin, Bian & Xu, 2015) and immunomodulating (Stuyven et al., 2010) activities. This just explain the mechanism of immune modulating activity observed in our work and provides the theoretical basis for more studies.

Conclusion

For the first time a *Pythium insidiosum*-cell wall β -glucan was successfully extracted, characterized and tested to biological activities. Based on the results mentioned above, the branched (1,3)(1,6)- β -D-glucan the major component of the tested extract could be implicated in the immunomodulatory potential observed by *in vitro* lymphoproliferation ability and *in vivo* induction of Th17 responses in mice. Future studies aiming purification of this β -D-glucan and

its application on pythiosis or against different fungal infections are needed to better to know its biological potential.

Acknowledgments

E. S. L. is a PhD fellow of *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (PNPD-CAPES).

References

- Aronson, J. M., Cooper, B. A., & Fuller, M. S. (1967). Glucans of oomycete cell walls. *Science*, 155(3760), 332-335.
- Astronomo, R. D., & Burton, D. R. (2010). Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? *Nature reviews. Drug discovery*, 9(4), 308-324.
- Bar, E., Whitney, P. G., Moor, K., Sousa, C. R. E., & LeibundGut-Landmann, S. (2014). IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. *Immunity*, 40(1), 117-127.
- Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*, 22(1), 87-108.
- Botton, S. A., Pereira, D. I. B., Costa, M. M., Azevedo, M. I., Argenta, J. S., Jesus, F. P. K., Alves, S. H., & Santurio, J. M. (2011). Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. *Current Microbiology*, 62(4), 1225-1229.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Brown, G. D., & Gordon, S. (2005). Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cellular Microbiology*, 7(4), 471-479.
- Ceyhan, A. M., Akkaya, V. B., Gulecol, S. C., Ceyhan, B. M., Ozguner, F., & Chen, W. C. (2012). Protective effects of beta-glucan against oxidative injury induced by 2.45-GHz electromagnetic radiation in the skin tissue of rats. *Archives of Dermatological Research*, 304(7), 521-527.
- Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal beta-(1-->3), (1-->6)-glucans. *Mycological Research*, 111(Pt 6), 635-652.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131(2), 209-217.
- Clemons, K. V., Antonysamy, M. A., Danielson, M. E., Michel, K. S., Martinez, M., Chen, V., & Stevens, D. A. (2015). Whole glucan particles as a vaccine against systemic coccidioidomycosis. *Journal of Medical Microbiology*, 64(10), 1237-1243.
- Clemons, K. V., Danielson, M. E., Michel, K. S., Liu, M., Ottoson, N. C., Leonardo, S. M., Martinez, M., Chen, V., Antonysamy, M. A., & Stevens, D. A. (2014). Whole glucan particles as a vaccine against murine aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology*, 63(12), 1750-1759.

- Du, B., Lin, C. Y., Bian, Z. X., & Xu, B. J. (2015). An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 49-59.
- Fan, Y. P., Hu, Y. L., Wang, D. Y., Liu, J. G., Zhang, J., Zhao, X. J., Liu, X., Liu, C., Yuan, J., & Ruan, S. L. (2012). Effects of *Astragalus polysaccharide* liposome on lymphocyte proliferation *in vitro* and adjuvanticity *in vivo*. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 68-74.
- Gaastra, W., Lipman, L. J. A., De Cock, A. W. A. M., Exel, T. K., Pegge, R. B. G., Scheurwater, J., Vilela, R., & Mendoza, L. (2010). *Pythium insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology*, 146(1-2), 1-16.
- Huang, H. B., Ostroff, G. R., Lee, C. K., Specht, C. A., & Levitz, S. M. (2010). Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan particles. *Mbio*, 1(3), e00164-00110.
- Kyanko, M. V., Canel, R. S., Ludemann, V., Pose, G., & Wagner, J. R. (2013). β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(1), 41-45.
- Liu, X. Y., Wang, Q., Cui, S. W., & Liu, H. Z. (2008). A new isolation method of beta-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids*, 22(2), 239-247.
- Melida, H., Sandoval-Sierra, J. V., Dieguez-Uribeondo, J., & Bulone, V. (2013). Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types. *Eukaryotic Cell*, 12(2), 194-203.
- Mendoza, L., & Newton, J. C. (2005). Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Medical Mycology*, 43(6), 477-486.
- Moraes, A. S., Santurio, J. M., Tomich, T. R., Abreu, U. G. P., Juliano, R. S., & Fernandes, F. A. (2013). Pitium-Vac® – Imunoterápico contra Pitiose Equina. *Impactos Econômicos, Sociais e Ambientais de Tecnologias da Embrapa Pantanal* (Vol. 2013). Corumbá: Embrapa Pantanal.
- Novaes-Ledieu, M., & Jimenez-Martinez, A. (1968). The structure of cell walls of phycomycetes. *Journal of General Microbiology*, 54(3), 407-415.
- Qi, C. J., Cai, Y. H., Gunn, L., Ding, C. L., Li, B., Kloecker, G., Qian, K. Q., Vasilakos, J., Saijo, S., Iwakura, Y., Yannelli, J. R., & Yan, J. (2011). Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived beta-glucans. *Blood*, 117(25), 6825-6836.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews: Immunology*, 11(4), 275-288.

- Santos, C. E. P., Marques, L. C., Zanette, R. A., Jesus, F. P. K., & Santurio, J. M. (2011). Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(8), 1397-1399.
- Santurio, J., Alves, S., Pereira, D., & Argenta, J. (2006). Pythiosis: an emergent mycosis. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34(1), 1-14.
- Sassaki, G. L., Elli, S., Rudd, T. R., Macchi, E., Yates, E. A., Naggi, A., Shriver, Z., Raman, R., Sasisekharan, R., Torri, G., & Guerrini, M. (2013). Human (α 2 -> 6) and avian (α 2 -> 3) sialylated receptors of influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. *Biochemistry*, 52(41), 7217-7230.
- Sassaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., & Iacomini, M. (2005). Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, 340(4), 731-739.
- Sassaki, G. L., Guerrini, M., Serrato, R. V., Santana, A. P., Carlotto, J., Simas-Tosin, F., Cipriani, T. R., Iacomini, M., Torri, G., & Gorin, P. A. J. (2014). Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. *Carbohydrate Polymers*, 104(s/n), 34-41.
- Stuyven, E., Verdonck, F., Van Hoek, I., Daminet, S., Duchateau, L., Remon, J. P., Goddeeris, B. M., & Cox, E. (2010). Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan to dogs temporally changes total and antigen-specific IgA and IgM. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(2), 281-285.
- van de Veerdonk, F. L., & Netea, M. G. (2010). T-cell subsets and antifungal host defenses. *Current Fungal Infection Reports*, 4(4), 238-243.
- Vetvicka, V. (2011). Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World Journal of Clinical Oncology*, 2(2), 115-119.
- Wuthrich, M., Gern, B., Hung, C. Y., Ersland, K., Rocco, N., Pick-Jacobs, J., Galles, K., Filutowicz, H., Warner, T., Evans, M., Cole, G., & Klein, B. (2011). Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 554-568.

Tab 1 – Glucan content of *Pythium* spp. mycelia and β-glucan extract

Sample	Measured glucan content ^b (% w/w)		
	Total glucan	α-glucan	β-glucan
<i>Pythium insidiosum</i> clinical isolates			
Pi-135	23.01	5.08	17.94
Pi-187	28.71	4.81	23.90
Pi-210	26.47	2.57	23.90
Pi-271	23.57	5.10	18.47
Pi-255	19.07	4.90	14.17
Pi-260	18.86	3.49	15.37
Pi-289	26.14	3.13	23.01
Pi-290	23.14	3.58	19.57
Pi-291	23.35	2.77	20.58
Pi-293	25.07	3.58	21.50
Pi-294	19.07	3.33	15.74
Pi-295	17.14	3.00	14.14
Pi-296	26.14	4.33	21.82
All clinical isolates ^a	23.06 ± 3.55	3.82 ± 0.91	19.24 ± 3.57
Reference strains			
<i>Pythium insidiosum</i> ATCC 58.637	31.71	2.86	28.85
<i>Pythium insidiosum</i> CBS 101.555	25.10	4.29	20.81
<i>Pythium aphanidermatum</i> CBS 128995	24.90	2.72	22.18
Glucan extract	66,00	0,09	65,91

^a, values are express as mean ± SD; ^b, determined by the β-glucan assay kit (Megazyme®)

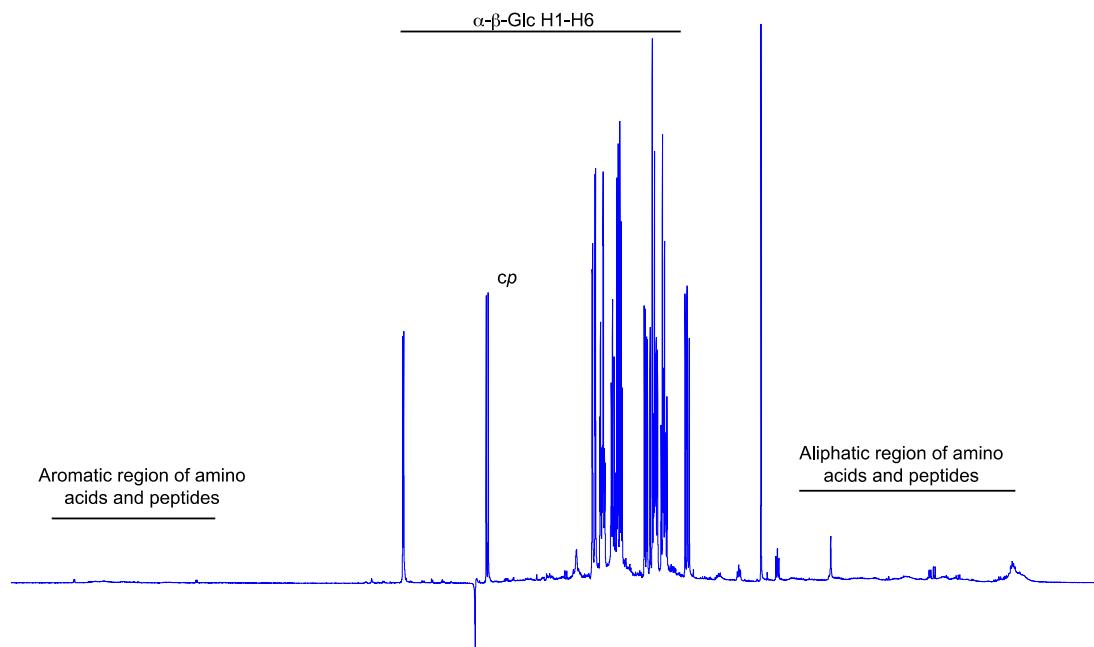


Figure 1 - ${}^1\text{H}$ NMR spectrum of the hydrolyzed polysaccharide from *P. insidiosum*. Integration and identification of the carbohydrate region revealed Glc as major component. The carbohydrate content was estimated and quantified $\sim 81.7\%$. The chemical shifts were obtained at 600 MHz in D_2O at 303K.

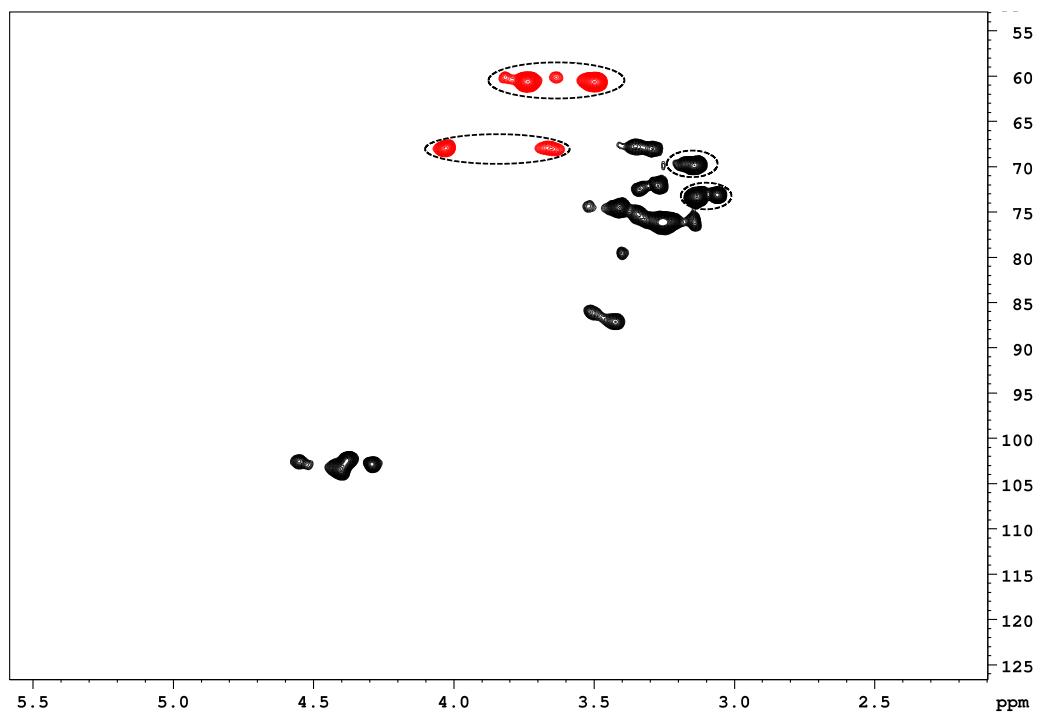


Figure 2 - 2D edited-HSQC NMR spectrum, positive phase (black) correspond to CH and negative phase (red) correspond to CH₂. ¹H/¹³C NMR signals of *P. insidiosum* β-Glucan were determined via COSY and HSQC.

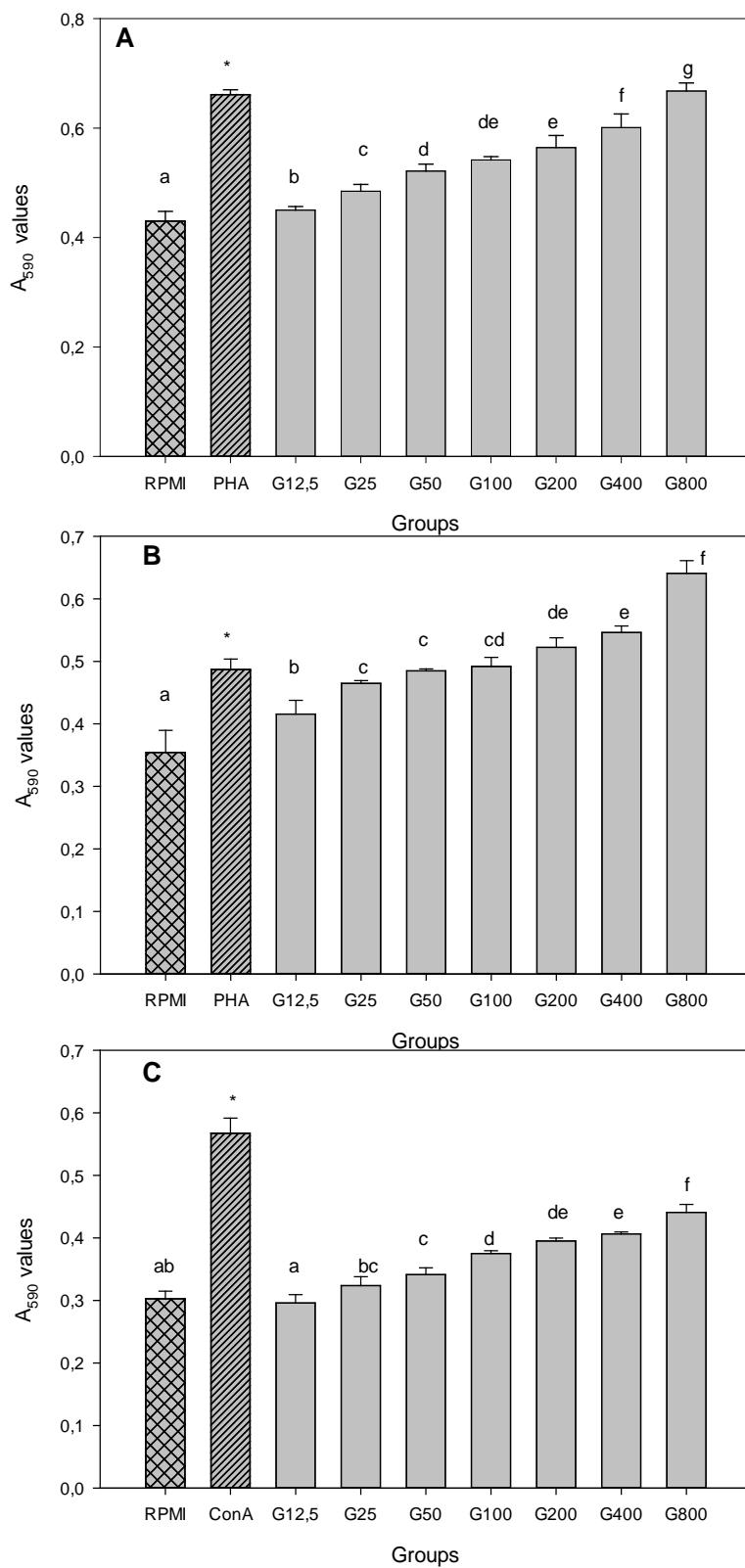


Figure 3 - Changes of lymphocyte proliferation of spleen cells from equine (A), human (B) and mice (C) stimulated with β -glucan (G12.5 – G800 μ g/mL), Phytohemagglutinin (PHA) or Concanavalin A (ConA) [A₅₉₀ value]. Data presented as means \pm DP ($n = 5$). Different lower case letters indicate significant difference between β -glucan concentrations and cell control (RPMI) ($p < 0.01$). * indicate $P < 0.01$ in comparison with the cell control.

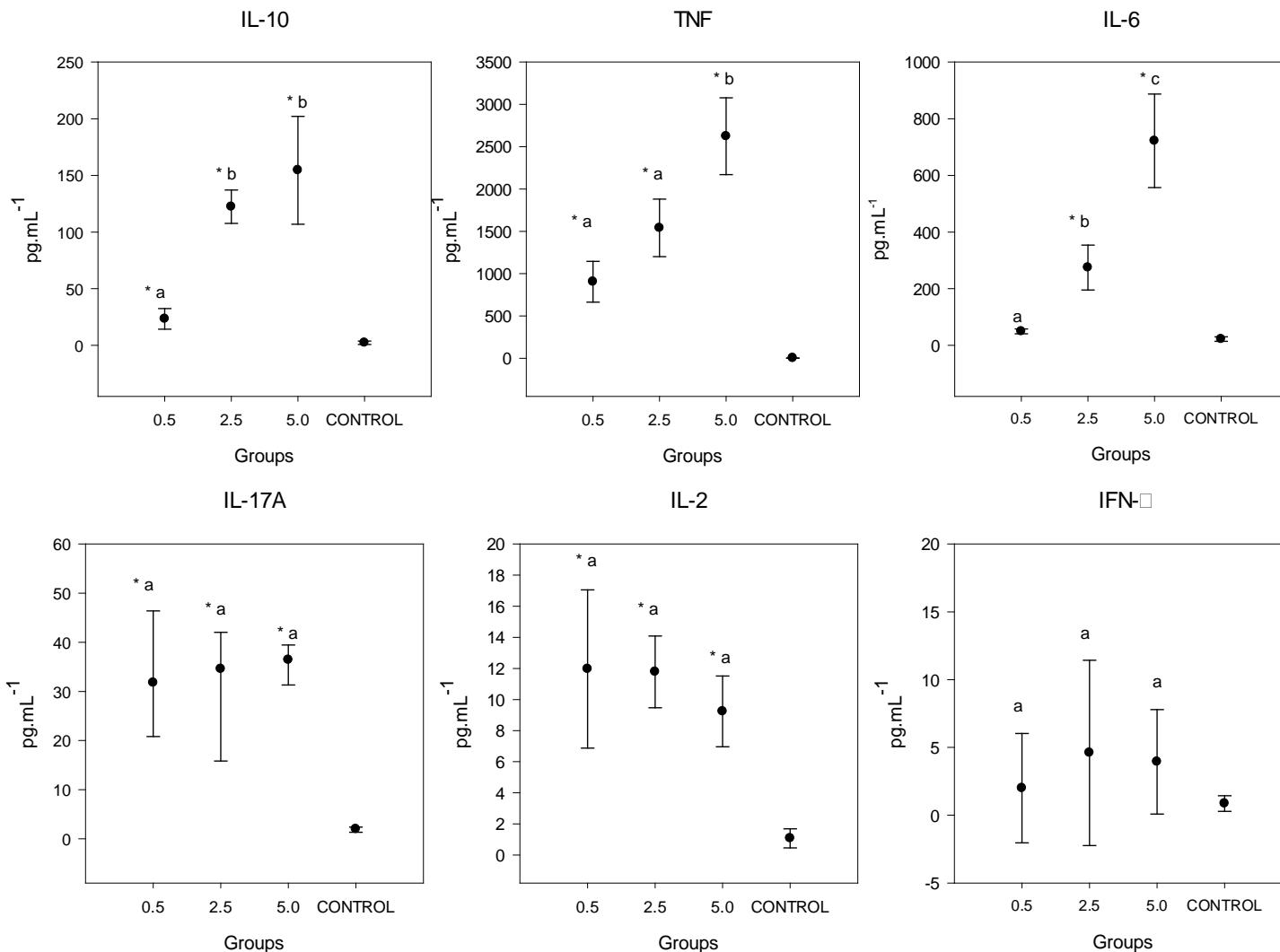


Figure 4 - Cytokine production by spleen cells from mice vaccination with 0.5, 2.5 or 5.0 mg of β -glucan extract at two weeks post treatment. Mouse spleen cells were cultured in 5% CO_2 at 37°C in the presence of β -glucan 0.5 – 5.0 mg/mL. After incubation up to 72 h, cytokine levels in the supernatant of lymphocytes culture were measured by flow cytometry. Control group received just phosphate buffered saline (PBS). All vaccinations were given once weekly for three consecutive weeks. Each point plot represents means \pm SD ($n = 5$). * Significant difference compared to control ($p < 0.01$). Different letters indicated significant difference between treatments ($p < 0.05$).

**6 MANUSCRITO 3 – INSIGHTS ON TO THE CELLULAR RESPONSE TO
PYTHIUM INSIDIOSUM ZOOSPORES INFECTION IN A CHEMICAL-INDUCED
IMMUNOSUPPRESSIVE MURINE MODEL OF PYTHIOSIS**

Artigo no formato *Full-Length Paper* para submissão ao periódico **Infection and Immunity** (Print ISSN: 0019-9567; Online ISSN: 1098-5522)

Title: Insights on to the cellular response to *Pythium insidiosum* zoospores infection in a chemical-induced immunosuppressive murine model of pythiosis

Running title: Insights on to the cellular response to *P. insidiosum*

Authors: Juliana S. M. Tondolo¹, Pauline C. Ledur¹, Érico S. Loreto¹, Francieli K. de Jesus², Taiara M. da Silva³, Glauzia D. Kommers⁴, Sydney H. Alves⁵, Janio M. Santurio¹

Affiliations

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

⁴ Laboratório de Patologia Veterinária, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

Address for correspondence:

Janio Morais Santurio

Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Phone/Fax: +55 55 32208906. E-mail: janio.santurio@gmail.com

Abstract

The immunology of pythiosis was studied and the role of Th1, Th2 and Th17 cytokines in host response to *P. insidiosum* was characterized in immunosuppressed mice. We tested two immunosuppressive protocols: cyclophosphamide (CYP) 150 mg/Kg intraperitoneal (i.p.) was given once 24 h before zoospore inoculation, and CYP 200 mg/Kg (i.p.) three days before infection plus hydrocortisone acetate (HCA) 250 mg/Kg 24 h (subcutaneous) before challenge. BALB/c mice were infected by subcutaneous injection of 2×10^4 zoospores/mouse. The immunosuppression was established with one dose of CYP (200 mg/Kg) followed by one dose of HCA (250 mg/kg). Mortality started at 48 h after inoculation and stabilized at ninth day, and the rates were 60%. Histopathological findings in kidney and livers suggested an acute vascular inflammation that mimics the vascular pythiosis in humans. Cytokine profiles in the supernatant of spleen cells from infected mice showed higher levels of IL-10, IL-6 and TNF- α . Increased IL-10 values are related to fungal infection's susceptibility and led us to speculate that infection can be established by an immunosuppression in host immune response triggered by *P. insidiosum* cell-wall components or to exoantigens released during infection.

Keywords: Pythiosis; fungal infection; cytokines

Introduction

Pythiosis is a chronic pyogranulomatous and life-threatening disease that affect humans and other animals. The etiologic agent is the oomycete *Pythium insidiosum*, a fungal-like organism (1). Equines are the most frequent animal affected by pythiosis and the disease appears as an ulcerative, pyogranulomatous lesion on cutaneous/subcutaneous tissue (2). In humans can occur as cutaneous/subcutaneous, vascular, ocular and disseminated forms (3).

The presence of a chronic infection with eosinophilia, a high serum level of Immunoglobulin E (IgE) in human and horses led researchers to postulate that a Th2 response is probably activated by the immunogens expressed by *P. insidiosum* in the infected hosts. Furthermore, the exoantigens produced during infection can play a key role on locking the immune system into a Th2 subset, as reviewed by É. S. Loreto, et al. (4). On the other hand, the immunotherapy with immunogens extracted from *P. insidiosum* mycelium has curative properties associated with a switch from a Th2 to a Th1 response (5-7). However, the immunological mechanism underlying the response to natural infection and to immunotherapy approaches were not fully clarified. Indeed, in the group of animal-pathogenic oomycetes, little is known regarding the major molecular players involved in host-pathogen interactions (8).

Animal models are important for studying the pathogenesis, virulence, immunology, diagnosis and treatment of fungal infections. Various species of animals have been used in mycological investigation, with the mouse being the species of choice (9, 10). Recently R. A. Zanette, et al. (11), described an experimental model of pythiosis in *Drosophila melanogaster*. Up to now, experimental pythiosis studies on vertebrate animals are conducted with rabbits since they are the only animal susceptible to experimental infection (2, 12). Although rabbit models are quite useful for the study of fungal infections, and their treatment, they are more expensive to purchase, their husbandry requires special installations and careful monitoring, and more important, there are few immunological and biomolecular reagents available (9).

In this context, the objective of this study was to develop a feasible murine model of pythiosis in attempted to better understand the immunology of this infection.

Materials and methods

Microrganism and zoosporogenesis

A clinical *P. insidiosum* Pi-135 isolate from equine case was utilized. Briefly, zoospores were obtained by the zoosporogenesis technique (12) and counted using a Neubauer chamber. The clinical isolate was previously identified (JSM Tondolo et al., unpublished) and the nucleotide data for the *P. insidiosum* Pi-135 isolate were deposited in GenBank under accession number KJ133548.

Mice

Forty female BALB/c mice, 6-8 weeks old, were used in this study ($25.30 \text{ g} \pm 2.23$). Animals were housed in groups of ten in which cage and allowed access to food and water *ad libitum*. All animal experiments were done with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee at the Federal University of Santa Maria (number 071/2014).

Immunosuppression and Infection

Mice were rendered susceptible to infection with *P. insidiosum* by immunosuppression with cyclophosphamide (CYP, Baxter) (13) or a combination of (CYP) and hydrocortisone acetate (HCA, Sigma-Aldrich®) (14). At the first time, we tested two protocols with 10 mice/group: group CYP received just one dose of CYP 150 mg/kg, 24 h before the infection; group CYP+HCA received 72 h before the challenge, a dose of CYP (200 mg/kg) and one 24 h before challenge a dose of HCA (250 mg/kg). CYP was reconstituted in sterile distilled water and administered via intraperitoneal injection, and HCA was prepared as a suspension in sterile

phosphate-buffered saline (PBS) with 0.02% Tween 80 and given by subcutaneous injection. On day 0, mice were infected with a subcutaneous injection of 2×10^4 zoospores/mouse, an inoculum concentration known to induce experimental pythiosis in rabbits (12). In the second experiment, to analyze the immunological status, we choice the CYP+HCA immunosuppression protocol and then more 20 mice were immunosuppressed and infected. The animals were monitored daily up to 14th day of infection for signs of morbidity and mortality, if any. As a control group, five healthy mice were used. The body weight of the animals was recorded daily. Individual organs (kidney, liver and lung) of mice naturally death or euthanized were cultured on corn-meal agar (CMA – Himedia®) at 37 °C for a week. If growth occurred, confirmation of pythiosis was made by zoosporogenesis and PCR techniques.

Ethics procedure

All standard animal husbandry practices were followed meticulously during the course of study. Appropriate steps were adopted to keep the mice free from stress or discomfort. To further prevent distress to animals, humane endpoints were established at the very beginning of experiment. Throughout study, the mice were examined 3–4 times daily for clinical signs such as rapid or very slow, shallow and labored breathing, ruffled fur, hunched posture, impaired ambulation, lethargy/drowsiness. Other signs taken into consideration included physical and mental alertness, chronic diarrhea and bleeding. These signs were used to sacrificing the animals during the course of the study and at the endpoint, and the euthanasia was performed by deepening anesthesia with isoflurane (Cristalia®).

Immunological studies

To evaluate the immunological response of the mice to pythiosis infection, we choice the combined protocol CYP+HCA. Spleen of each mouse from healthy and pythiosis infected

mice were removed aseptically, minced and passed through a stainless steel mesh to obtain single cell suspensions in PBS. After the red blood cells were disrupted, the splenocytes were washed twice with PBS, and the resulting pellet was re-suspended and diluted in a complete tissue culture medium [CTCM: RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®), 10% fetal bovine serum (Vitrocell Embriolife®), penicillin-streptomycin (100 U and 100 µg/mL, respectively - Sigma-Aldrich®)] after the cell viability was assessed by trypan blue (Sigma-Aldrich®) exclusion. All lymphocyte's suspensions were diluted to 2×10^6 mL⁻¹ in CTCM. Lymphocyte from infected mice were cultivate just with RPMI-1640 (non-stimulated) or stimulate with *P. insidiosum* cell wall β-glucan (as mitogen) at 0.1 mg. mL⁻¹ (unpublished manuscript).

Cytokine measurement

Supernatant fluids were collected for cytokine determination from cultures of splenocytes of each mouse, in triplicate, after 72 h of culture at 37 °C in a 5% humidified CO₂ atmosphere. These were then frozen at – 80 °C until being analyzed. Cytokines were measured by the mouse Th1/Th2/Th17 cytokines Cytometric Bead Array (CBA) kit (BD Biosciences, San Jose, CA), which measures IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF and IL-17A. Data were acquired on BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, USA) flow cytometer. Assay was performed according to the manufacturer's instructions.

Histology

The tissues of lung, liver and kidney were collected of all mice used in the second experiment (naturally death and euthanized). Formalin-fixed tissues were embedded in paraffin, sectioned at 3 µm, stained with hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemistry (IHC) with a polyclonal antibody anti-*P. insidiosum* raised in rabbit was performed as previously described (15). Negative control slides (with antibody diluent as the primary antibody) and a

positive control tissue (obtained from a confirmed case of equine pythiosis) were included with each immunohistochemistry procedure.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.D. Significance was assessed by ANOVA one way followed by Holm-Sidak post-hoc. All analysis were performed on software SigmaPlot[®] version 12.5. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

Results

Immunosuppression –course of infection

First experiment

For the CYP protocol, the course of infection was less severe and mortality was not observed (Fig. 1). During the experiment, five mice showed a nodular formation at the site of infection; two displayed a dry lesion, and three showed no reaction. The loss of corporal weight was not significant (mean \pm SD = 23.78 ± 1.21 at day 0 and 23.2 ± 0.97 at day 14). In the CYP+HCA protocol, the course of infection was most severe than in the CYP protocol. Mortality occurred early in infection, beginning at 48 h after zoospore's inoculation with four mice (40%), at 72 h more one mouse died (50%), and the last death occurred at 10 days after infection (60%) (Fig. 2). The mouse that died at 72 h was euthanized because it showed difficulty breathing and lethargy signs. The remaining mice presented a dry lesion at the site of infection. The loss of body weight was higher than in CYP protocol, but did not achieve 20% of initial weight (mean \pm SD = 26.40 ± 1.72 at day 0 and 22.6 ± 1.37 at day 14). Once the CYP+HCA protocol allowed the development of a lethal infection, this protocol was used for the second experiment (immunological studies).

Second experiment

In this experiment, mortality also started early, with three mice at 48 h (15%), more three at day 4 (30%), four mice at day 5 (50%), one mouse at day 7 (55%), and the last death at day 9 (60%) post infection. Mortality rate was the same observed in the first experiment with CYP+HCA protocol. Mice presented difficulty breathing, lethargy and paralysis of the lower limbs. No cutaneous reaction was observed at the site of infection during experiment.

Histopathology

The histopathological analysis demonstrated that on the kidney of nine of 20 infected animals were observed focally extensive coagulation necrosis associated with severe multifocal thrombosis in arteries, arterioles and venules. In the midst of thrombi were observed negative images of hyphae and weakly basophilic hyphae. These hyphae were occasionally branched, occasionally septate and some were observed in the interstice of the necrotic area, where there was slight, predominantly neutrophilic inflammatory infiltrate. In the remaining 11 mice were not observed hyphae; cortical multifocal acute tubular necrosis was observed in six mice, and in five mice, no changes in the normal structure were observed (Fig. 3A-D).

In the liver from five of 20 animals, there was a marked multifocal arterial and venous thrombosis. In the midst of thrombi (and sometimes in the vessel wall) there are numerous negative images of hyphae and weakly basophilic hyphae. Hyphae were occasionally seen in sinusoids. There was necrosis of hepatocytes, and inflammatory neutrophilic infiltrate in the areas adjacent to the affected vessels. Some vessels have neutrophilic infiltrate in the wall (neutrophilic vasculitis); neutrophils are also numerous among the thrombi. In the remaining from the 15 mice were observed mild multifocal vacuolization of the cytoplasm of hepatocytes in eight mice; slight focal necrosis in two mice; and a multifocal marked to coalescing areas of necrosis in hepatocytes, interspersed with a few neutrophils in five mice (Fig. 3E-F).

The majority of the animals have been mild to moderate fibrinoid necrosis in arterioles walls, sometimes with mild thrombosis when the lungs were evaluated; marked congestion of the capillaries and multifocal septal hemorrhage in alveoli and slight presence of fibrin, and some neutrophils in alveoli were observed. Hyphae were not observed (Figure 3G).

Animals that survived the experiment end point (day 14) and were euthanized, had a blackened area at the site of inoculation of zoospores and the histopathology detected the presence of hyphae with neutrophilic infiltrate and necrosis in the skin of six (n=8) surviving animals (Figure 3H).

Cytokine's production by spleen cells

To determine whether *in vivo* experimental pythiosis could modify the cytokine production, we analyze the supernatant of spleen cells culture. The cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ and TNF- α were measured in cultures of β -glucan-stimulated cells (P-Glucan) and non-stimulated (P-N/S) spleen cells, but detectable levels were only observed for IL-6, IL-10 and TNF- α cytokines. P-Glucan (IL6, 432.82 ± 90.2 ; IL-10, 112.79 ± 12.53 ; TNF- α , 1612.96 ± 325.58) and P-N/S (IL6, 21.62 ± 7.56 ; IL-10, 17.07 ± 6.33 ; TNF- α , 37.65 ± 12.81) groups had significant higher concentration of all detected cytokines than healthy control (IL6, 8.07 ± 3.16 ; IL-10, 1.03 ± 0.53 ; TNF- α , 2.02 ± 0.47) (Fig. 4).

Discussion

Several studies evaluating fungal infections in mice use chemical immunosuppression protocols to favor the development of the disease (10). Cyclophosphamide is a non-phase specific cytotoxic agent that can inhibit both humoral and cellular immunity, affecting granulocytes and lymphocytes (16). The effects of corticosteroids are pleiotrophic, affecting both T and B cells, macrophages, granulocytes, and monocytes (17). Combining cytotoxic

chemotherapy and corticosteroids appears to augment each, as either alone may not result in consistently lethal infections (18). In this way, we induced pythiosis in a mice immunosuppressed with a combination of CYP and HCA, a well-documented protocol (14, 19, 20).

Immunosuppression greatly altered disease outcome, with subcutaneous zoospore's inoculation leading to death, while immunocompetent mice developed a self-healing ulcerative subcutaneous lesion (personal data). Approximately 48 h after the subcutaneous inoculation of *P. insidiosum* zoospores in CYP+HCA immunosuppressed group, the first mice have died and mortality reached at 60%. We observed during the experiment that some mice had difficulty breathing, lethargy and paralysis of the lower limbs. The ulcerative skin lesion, characteristic of subcutaneous pythiosis in immunocompetent animals, as rabbits, was not seen. The death of animals can be explained by the dissemination of the oomycete and the colonization of vital organs. The histopathological findings in kidney and livers, suggested an acute vascular inflammation, similar to vascular pythiosis that occurs in humans (3).

The invasion of large arteries of the limbs is commonly diagnosed in human patients from Thailand. This condition leads to obstruction of blood vessels, aneurysms, and gangrene of the affected limbs. Arterial pythiosis is a life-threatening condition, especially when *P. insidiosum* reaches the aorta and the major cause of death is the rupture of aortic aneurysm (3). In this way, our pythiosis infection model in mice can be very useful to study therapeutic approaches in human pythiosis.

The host immune response to natural *P. insidiosum* infection is thought to be a Th2 response with eosinophilic inflammation and release of IL-4 and IL-5 associated to disease progression (7). Indeed, in a human patient with vascular pythiosis, high levels of IL-4 and IL-5 cytokines were detected during the infection (5). However, evaluation of cytokine levels in animals with pythiosis was not performed.

In this study, all infected animals presented a high level of IL-6, IL-10 and TNF- α compared with healthy mice. This mix of cytokines with up-regulation of IL-10 and not a typical Th1 response with high levels of IFN- γ may be partially responsible for the impediment of a total clearance of the fungus. The same set of cytokines have been demonstrated to mediate the normal immune response and to be responsible for the immunopathogenesis of systemic mycoses such as coccidioidomycosis and paracoccidioidomycosis (21, 22).

IL-10 represents an important cytokine that may affect the Th1/Th2 balance in fungal infections. This cytokine is known to be a major immunoregulatory cytokine influencing Th cell development as well as production of numerous pro-inflammatory cytokines (23). High levels of IL-10 that downregulate IFN- γ production, are detected in chronic candidal diseases, in the severe forms of endemic mycoses and in neutropenic patients with aspergillosis, and thus have been linked to susceptibility to fungal infections (24, 25). Indeed, in chronic mucocutaneous candidiasis (CMC) the defective production of Th 1 cytokines does not occur concomitantly with the increase in Th 2 cytokine production (that is, IL-4 or IL-5) but, more often, with IL-10 (26). The same was observed in our study, high IL-10 levels and absence of IFN- γ and IL-4 production.

Our data are in agreement with previous studies on pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA), where chemotherapy-treated mice presented high levels of pro and anti-inflammatory cytokine responses (TNF- α and IL-10, respectively), and IL-10 was associated to increase in mortality and to pathogenesis of IPA (17, 27). Because several cell types produce IL-10, mainly CD4 $^{+}$ T regulatory cells, early secretion of this cytokine cannot be used as a marker of Th2 activation (28). Furthermore, the absence of IL-4 secretion observed in our study renders it difficult to ascribe infection development to a typical activation of Th2 cells.

A recent study with *Saprolegnia parasitica*, also an oomycete, that cause infection in fish, observed a strong induction of proinflammatory cytokines triggered by the cell wall

components and the immune suppression of the most genes related to cytokines associated with Th cell responses that compromised Th1 and Th2 responses in infected animals. They concluded that an active suppression of fish adaptive immunity during infection is responsible by immune system failure to respond adequately to infection (8). All these findings can lead to the speculation that *P. insidiosum* persistence in host tissues may be related to an immunosuppressive property of cell-wall components or to exoantigens released during infection.

We successfully establish the infection by *P. insidiosum* in immunosuppressed mice. This is extremely important once it will be a useful tool for future treatment tests, especially in human pythiosis cases. Cytokine profile of immunosuppressed-infected mice led us to speculate that infection may be established through an immunosuppression in the host immune response. The results should be interpreted with carefully and further studies using non-immunosuppressed mice and/or different protocols of immunosuppression should be conducted to clarify these findings.

Acknowledgments

E. S. L. is a PhD fellow of *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (PNPD-CAPES).

References

1. **Mendoza L, Vilela R.** 2013. The mammalian pathogenic oomycetes. *Curr Fungal Infect Rep* **7**:198-208.
2. **Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L.** 2010. *Pythium insidiosum*: An overview. *Vet Microbiol* **146**:1-16.
3. **Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Pracharktam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuwan M, Somkaew S.** 2006. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* **43**:569-576.
4. **Loreto ES, Tondolo JS, Zanette RA, Alves SH, Santurio JM.** 2014. Update on pythiosis immunobiology and immunotherapy. *World J Immunol* **4**:88-97.
5. **Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, Suwanagool P, Manuskiatti W, Ruangsetakit C, Ajello L.** 2004. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine* **22**:3613-3621.
6. **dos Santos CEP, Santurio JM, Marques LC.** 2011. Pythiosis of livestock in the Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Pesq Vet Bras* **31**:1083-1089.
7. **Mendoza L, Newton JC.** 2005. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Med Mycol* **43**:477-486.
8. **Belmonte R, Wang T, Duncan GJ, Skaar I, Melida H, Bulone V, van West P, Secombes CJ.** 2014. Role of pathogen-derived cell wall carbohydrates and prostaglandin E2 in immune response and suppression of fish immunity by the oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Infect Immun* **82**:4518-4529.
9. **Capilla J, Clemons KV, Stevens DA.** 2007. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol* **45**:657-684.
10. **Kirkpatrick WR, Wiederhold NP, Najvar LK, Patterson TF.** 2012. Animal models in mycology: what have we learned over the past 30 years. *Curr Fungal Infect Rep* **7**:68-78.
11. **Zanette RA, Santurio JM, Loreto ES, Alves SH, Kontoyiannis DP.** 2013. Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. *Microbiol Immunol* **57**:732-735.
12. **Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Festugatto R, Lubeck I, Sallis ESV, Copetti MV, Alves SA, Ferreiro L.** 2003. Three types of immunotherapics against pythiosis insidiosi developed and evaluated. *Vaccine* **21**:2535-2540.
13. **Cenci E, Mencacci A, Bacci A, Bistoni F, Kurup VP, Romani L.** 2000. T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol* **165**:381-388.
14. **Sheppard DC, Rieg G, Chiang LY, Filler SG, Edwards JE, Jr., Ibrahim AS.** 2004. Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1908-1911.
15. **Gabriel AL, Kommers GD, Trost ME, Barros CSL, Pereira DB, Schwendler SE, Santurio JM.** 2008. Outbreak of cutaneous pythiosis in cattle. *Pesq Vet Bras* **28**:583-587.
16. **Huyan XH, Lin YP, Gao T, Chen RY, Fan YM.** 2011. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int Immunopharmacol* **11**:1293-1297.

17. **Lewis RE, Kontoyiannis DP.** 2009. Invasive aspergillosis in glucocorticoid-treated patients. *Med Mycol* **47**:S271-S281.
18. **Dixon DM, Polak A, Walsh TJ.** 1989. Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect Immun* **57**:1452-1456.
19. **Bok JW, Chung D, Balajee SA, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, Kirby KA, Keller NP.** 2006. GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun* **74**:6761-6768.
20. **Li XP, Gao MH, Han XL, Tao S, Zheng DY, Cheng Y, Yu RT, Han GG, Schmidt M, Han L.** 2012. Disruption of the phospholipase D gene attenuates the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **80**:429-440.
21. **Fornari MC, Bava AJ, Guereno MT, Berardi VE, Silaf MR, Negroni R, Diez RA.** 2001. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:1036-1038.
22. **Dooley DP, Cox RA, Hestilow KL, Dolan MJ, Magee DM.** 1994. Cytokine Induction in human coccidioidomycosis. *Infect Immun* **62**:3980-3983.
23. **Cyktor JC, Turner J.** 2011. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infect Immun* **79**:2964-2973.
24. **Romani L.** 2011. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **11**:275-288.
25. **Lass-Florl C, Roilides E, Loeffler J, Wilflingseder D, Romani L.** 2013. Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses* **56**:403-413.
26. **Lilic D.** 2002. New perspectives on the immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Infect Dis* **15**:143-147.
27. **Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M.** 2005. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **73**:494-503.
28. **Romani L, Puccetti P.** 2006. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol* **14**:183-189.

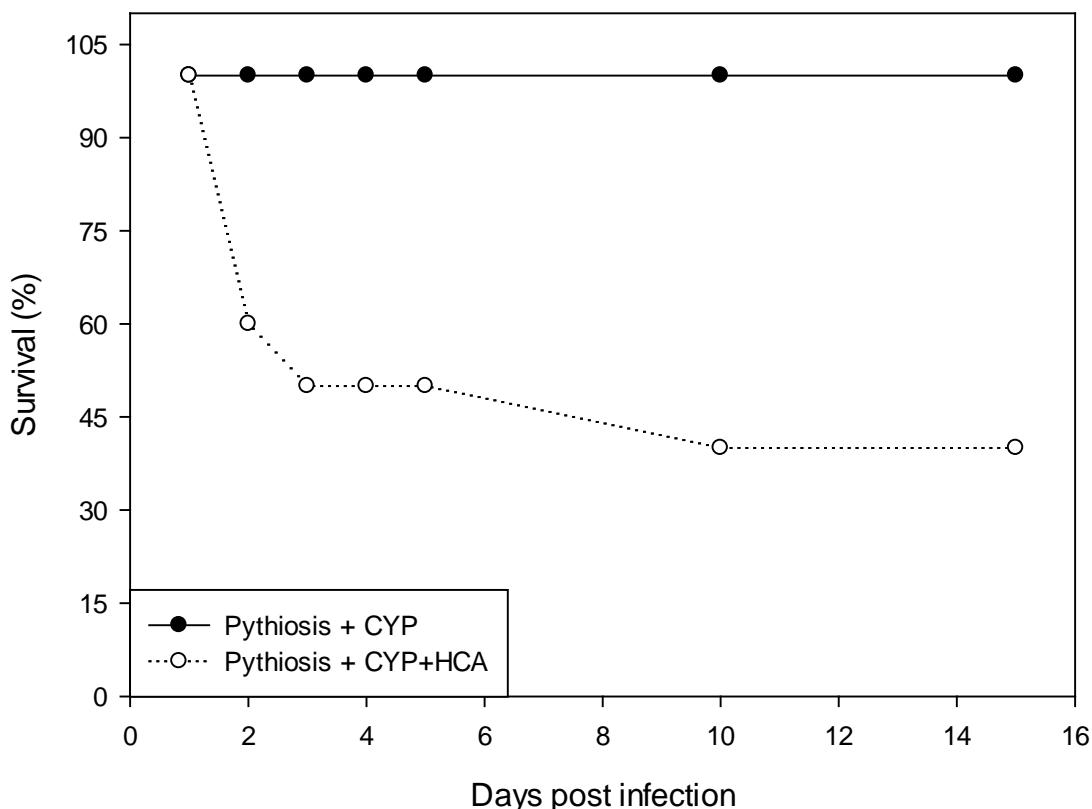


Fig. 1 - Survival of immunosuppressed mice experimentally infected by the subcutaneous route with 2×10^4 *P. insidiosum* zoospores. Mice were rendered susceptible with one dose of cyclophosphamide (CYP) 200 mg/Kg 24 h before infection (Pythiosis + CYP) or with one dose of CYP 200 mg/Kg plus one dose of hydrocortisone acetate (HCA) 250 mg/Kg, 72 h and 24 h before infection, respectively (Pythiosis + CYP+HCA). n = 10 mice per group. Survival was monitored up to 14 days.

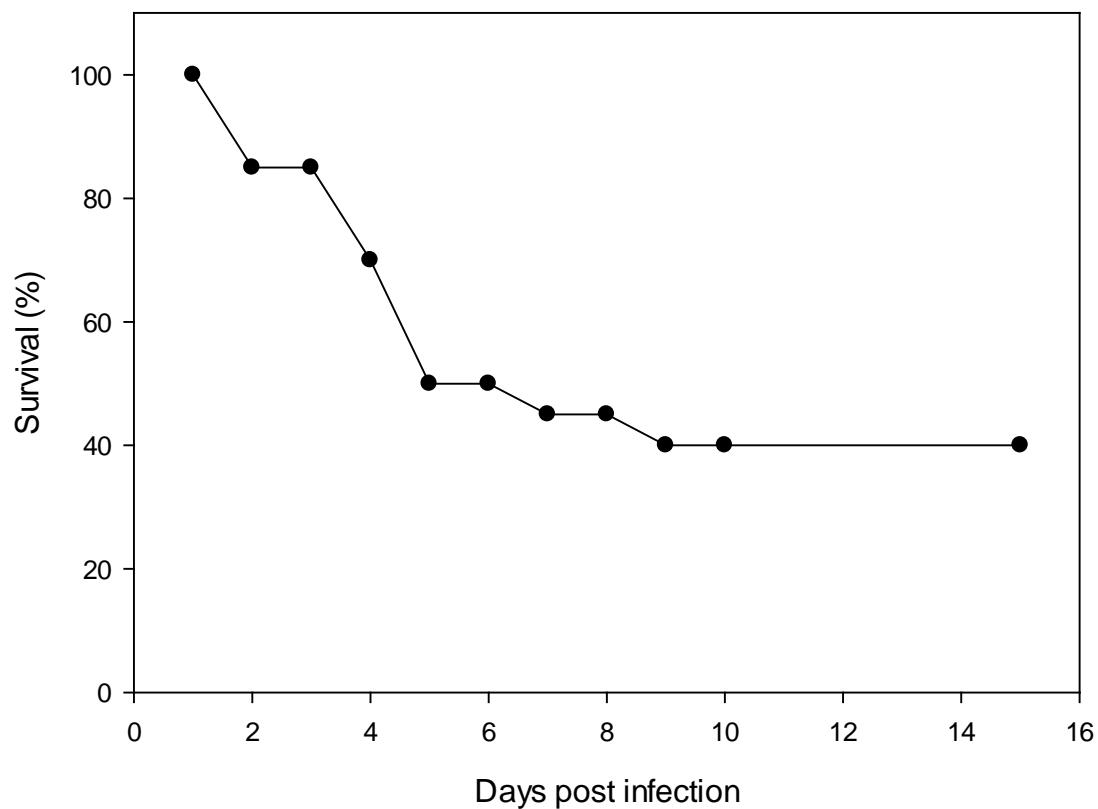


Fig. 2 – Survival of immunosuppressed mice experimentally infected by the subcutaneous route with 2×10^4 *P. insidiosum* zoospores. Mice were rendered susceptible with one dose of CYP 200 mg/Kg plus one dose of Hydrocortisone acetate (HCA) 250 mg/Kg, 72 h and 24 h before infection, respectively. $n = 20$ mice. Survival was monitored up to 14 days.

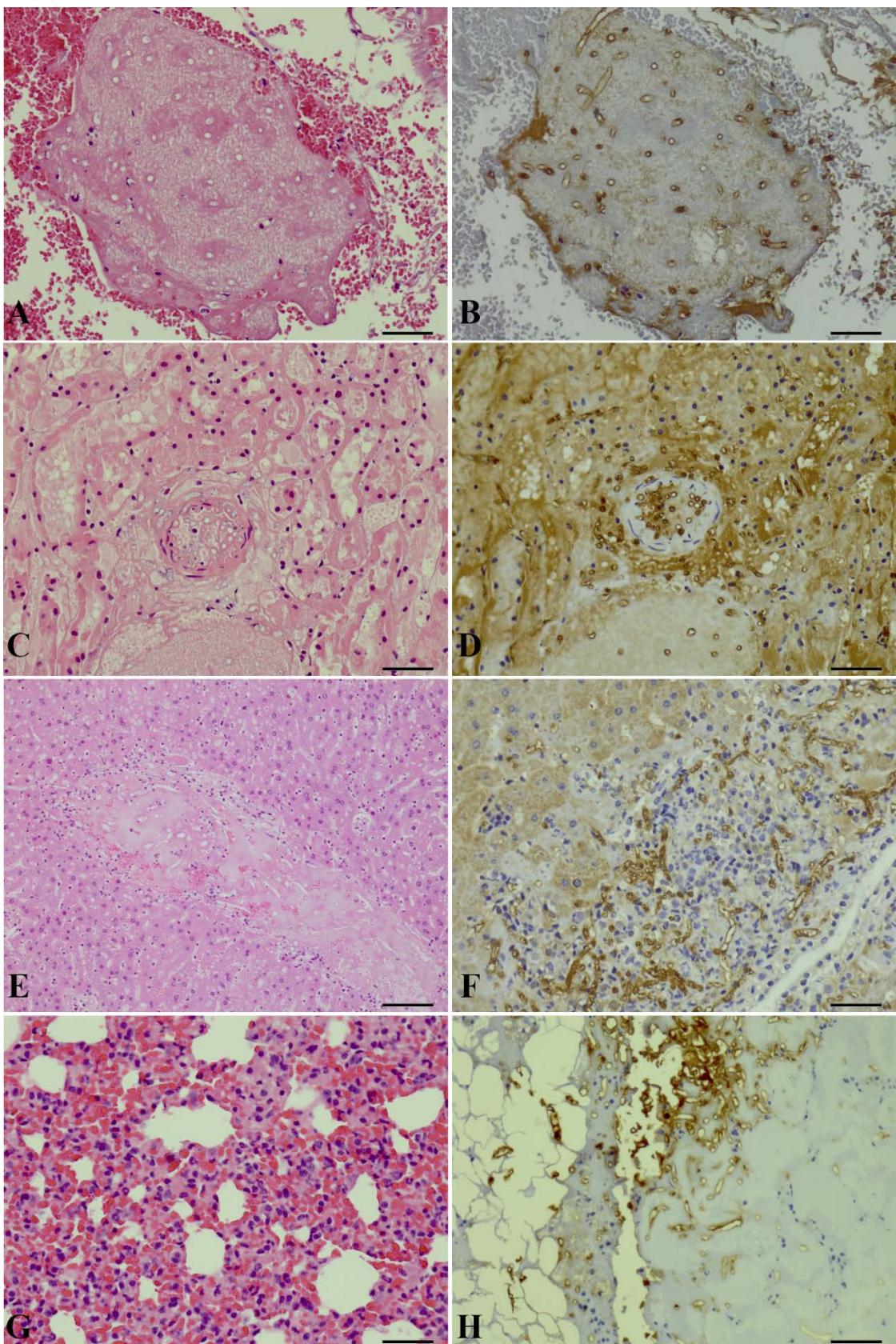


Fig. 3 - **A and C.** Kidney. thrombosis, necrosis and hyphae (as negative image). HE, magnification 400x.
B and D. Kidney. thrombosis, necrosis and positive staining hyphae. IHC, anti-*P. insidiosum*, alkaline phosphatase-streptavidin-biotin, magnification 400x. **E.** Liver. Thrombosis and hyphae. HE, magnification 400x.
F. Liver. Thrombosis and positive hyphae. IHC, anti-*P. insidiosum*, alkaline phosphatase-streptavidin-biotin, magnification 400x. **G.** Lung. No hyphae. HE, magnification 400x. **H.** Lesion skin. Hyphae, IHC.

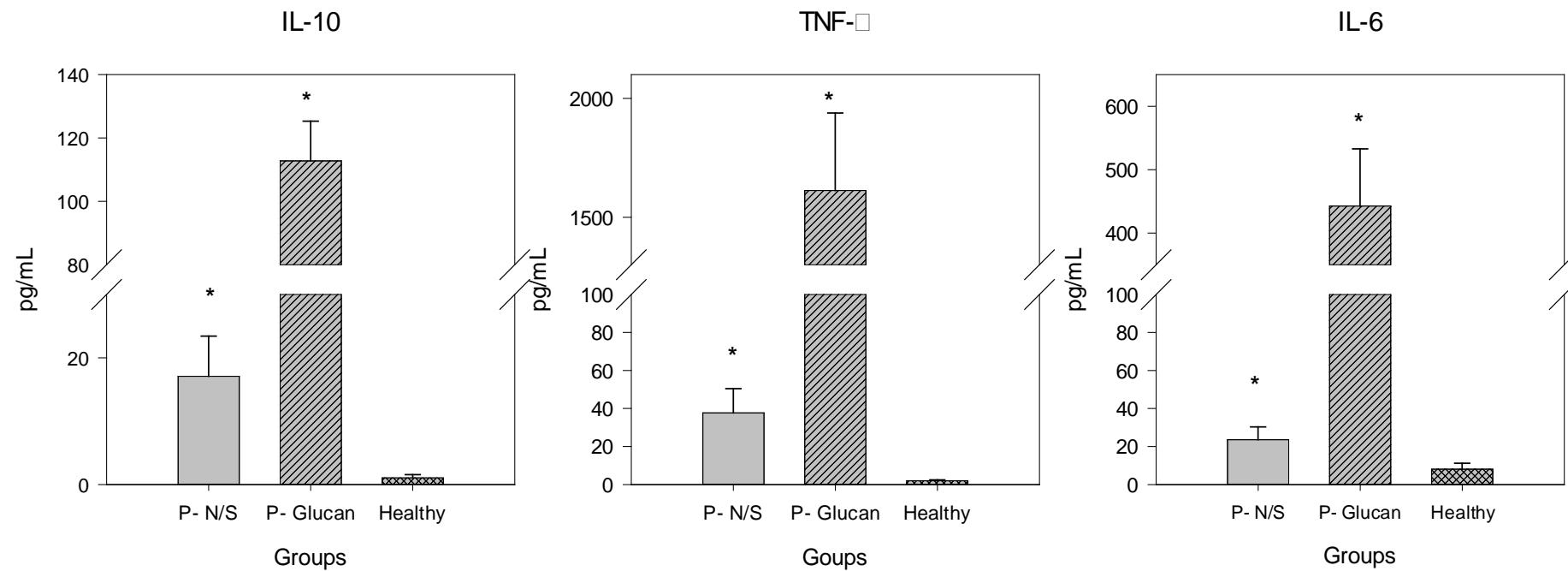


Fig. 4 - Cytokine secretion after mice immunosuppression and challenge with 2×10^4 *P. insidiosum* zoospores. Mouse spleen cells were incubated up to 72 h in 5% CO₂ at 37 °C, cytokine levels in the supernatant of lymphocytes culture were measured by flow cytometry. Mouse spleen cells from infected mice were cultured in the presence of β -glucan 0.1 mg/mL (P Glucan) or no stimulated (P N/S). Spleen cells of the control group were no stimulated (Healthy). Control group received just phosphate buffered saline (PBS) injection. Data are presented means \pm SD (n = 5). * Significant difference compared to Healthy group (p < 0.001).

7 DISCUSSÃO

Dados sobre a suscetibilidade de *Conidiobolus lamprauges* frente aos antifúngicos comumente utilizados são escassos e não existe um consenso sobre a melhor abordagem terapêutica para o tratamento das infecções causadas por *Conidiobolus* spp. (Chowdhary *et al.*, 2010; Kimura *et al.*, 2011; Reiss *et al.*, 2012). Nós avaliamos, no artigo 1, a suscetibilidade de seis isolados clínicos de infecção em ovinos frente a diferentes classes de antifúngicos, seguindo o protocolo M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute., 2008). Os resultados sugerem resistência ou reduzida suscetibilidade aos antifúngicos testados, com exceção da terbinafina (TRB) que foi o fármaco com melhor atividade inibitória. Nossos resultados estão de acordo com resultados prévios que avaliaram *C. lamprauges* e encontraram uma suscetibilidade reduzida, próxima a resistência, também excluindo a terbinafina (Guarro *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2011).

Em um segundo momento, nós avaliamos a associação de sulfametoxzazol (SMX), trimetoprima (TMP) e antifúngicos frente a *C. lamprauges* no manuscrito 1. Nós confirmamos o potencial sinérgico da associação entre SMX e TMP (100%) na proporção 1:4, respectivamente, mas não observamos interações sinérgicas quando a associação SMX-TMP foi combinada com os fármacos antifúngicos avaliados. A anfotericina B (AMB), a TRB e o miconazol (MON) foram considerados os fármacos mais eficazes por apresentarem as menores concentrações inibitórias mínimas (CIM, µg/mL). No entanto, como os pontos de cortes (*breakpoints*) ainda não foram caracterizados para os fungos filamentosos e baseado em sugestões de *breakpoints* contidas no protocolo M38-A2 para outros fungos filamentosos, sugere-se que neste estudo os isolados de *C. lamprauges* demonstraram resistência ou suscetibilidade reduzida, com exceção da TRB, confirmando os achados do artigo 1.

A pitiose caracteriza-se por ser uma infecção de difícil tratamento e também de difícil diagnóstico por ser confundida com outras infecções fúngicas. O sucesso terapêutico do tratamento da pitiose está intimamente relacionado com o diagnóstico precoce do patógeno (Gaastra *et al.*, 2010). Nós demonstramos, no artigo 2, a habilidade de um disco de minociclina em inibir o crescimento de 38 isolados clínicos de *P. insidiosum* provenientes de casos de pitiose equina e duas cepas padrão de *P. insidiosum*, utilizando a técnica de disco difusão. Como controle do teste de inibição foram utilizadas 18 cepas de diferentes fungos que não tiveram seu crescimento inibido pela presença do disco de minociclina. Uma vez que os fungos não foram inibidos e todas as cepas de *P. insidiosum* tiveram seu crescimento totalmente inibido, este teste pode ser utilizado como um método rápido de identificação de *P. insidiosum*. No entanto, recomenda-se que o diagnóstico definitivo da pitiose deva ser realizado por técnicas moleculares e/ou sorológicas e/ou avaliação imuno-histoquímica (Mendoza e Vilela, 2013).

A parede celular dos fungos exerce um papel importante na manutenção da integridade celular e também é o contato com o meio externo, representando assim um alvo interessante no controle de doenças (Bowman e Free, 2006; Melida *et al.*, 2013). Estudos sobre a constituição da parede celular de *Pythium* spp. são das décadas de 1960 a 1980 e relataram a presença de 80 a 90% de carboidratos, sendo as β -glucanas o principal carboidrato encontrado (Aronson *et al.*, 1967; Novaesle.M *et al.*, 1967; Bartnicki-Garcia, 1968; Sietsma *et al.*, 1969; Vaziri-Tehrani e Dick, 1980). Porém, estudos com *P. insidiosum* não foram realizados.

Nós avaliamos, no manuscrito 2, o micélio (em peso seco) de treze isolados clínicos de *P. insidiosum*, utilizando um kit enzimático para quantificação de glucanas e obtivemos uma média de $23,06 \text{ g} \pm 3,55$ de glucana total, $3,82 \text{ g} \pm 0,91$ de α -glucana e $19,24 \text{ g} \pm 3,57$ de β -glucana. O estudo de Kyanko *et al.* (2013) também realizou enzimaticamente a avaliação do conteúdo de glucanas do micélio seco de diferentes fungos, obtendo para *Aspergillus candidus* ($\approx 3.4\%$), *Fusarium graminearum* e *Trichoderma harzianum* ($\approx 6\%$), *Penicillium* e

Paecilomyces spp (\approx 17-23%). A comparação destes resultados com o obtido para *P. insidiosum* (\approx 23%) demonstram uma significante quantidade desse polissacarídeo na constituição do micélio de *P. insidiosum*.

Diversos estudos com β -glucanas extraídas principalmente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de cogumelos comestíveis, têm demostrado uma grande variedade de atividades fisiológicas, o que levou as β -glucanas a serem classificadas como modificadores de resposta biológica com pronunciado efeito imunomodulador (Novak e Vetvicka, 2009; Stier *et al.*, 2014). Devido ao potencial imunomodulador desse polissacarídeo, nós realizamos a extração do mesmo da parede celular de *P. insidiosum* utilizando, com pequenas modificações, um processo descrito por Liu *et al.* (2008) (manuscrito 2). O processo baseia-se na autólise induzida, seguida por tratamento com água quente e solventes orgânicos, homogeneização e tratamento enzimático com protease.

O extrato obtido (3,5 g), comparado com a massa total de micélio utilizada na extração (75 g) mostra um rendimento de aproximadamente 5%. A avaliação do extrato pelo kit enzimático mostrou um conteúdo de aproximadamente 66 % de β -glucana, que comparada com o conteúdo de β -glucana obtido inicialmente para cepa Pi-135 mostra a recuperação de 26% do conteúdo de β -glucana. A avaliação do conteúdo de proteínas pelo método de Bradford (1976) resultou em 1,8% de proteínas que só foram detectadas quando o extrato foi solubilizado em etanol. No entanto, a análise da composição do extrato por métodos físico-químicos (metilação, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa [CG-EM] e espectroscopia de ressonância magnética – RMN) mostrou um conteúdo de β -glucana de aproximadamente 82% e de aminoácidos e peptídeos residuais de 18%. Dois pontos podem ser destacados: primeiramente os métodos analíticos (CG e NMR) são mais precisos e têm maior poder de detecção, o que por si só justifica as diferenças encontradas no conteúdo de glucanas e proteínas; em segundo, por tratar-se de uma glucana altamente ramificada a enzima utilizada

pelo kit Megazyme® pode não ter sido totalmente eficiente na quebra da molécula levando a uma menor detecção.

A avaliação da composição de monossacarídeos do extrato evidenciou tratar-se de um polissacarídeo constituído exclusivamente por moléculas de glicose e o espectro de ^1H NMR apresentou sinais característicos de uma β -glucana e como contaminante foram observados sinais de aminoácidos e peptídeos residuais. Por tratar-se de um polímero ramificado contendo diferentes tipos de ligação glicosídica, procedeu-se a metilação da amostra e posterior análise por CG-EM e RMN que mostrou a presença de uma cadeia principal (1,3)-ligada e formada por unidades β -D- glicopiranosil parcialmente substituídas em O-6 por unidades β -D- glicopiranosil (1,6)-ligadas, em média a cada 1 ou 2 unidades da cadeia principal. Escleroglucana é um polissacarídeo secretado por fungos do gênero *Sclerotium* que também apresenta uma cadeia principal com unidades β -D- glicopiranosil (1,3)-ligadas e unidades laterais de β -D-glicopiranosil (1,6)-ligadas, várias atividades biológicas já foram descritas para essa β -glucana, entre elas: imunoestimulante, antioxidante, antiviral (Batbayar *et al.*, 2012; Giavasis, 2014). Dois dos mais estudados polissacarídeos com atividade imunomoduladora são o Lentinano e o Esquisofilano, extraídos dos cogumelos comestíveis *Lentinan edodes* e *Schizophyllum comune*, respectivamente, e ambos são comercializados como terapia no tratamento de câncer (Giavasis, 2014). Ambos polissacarídeos acima citados apresentam estrutura semelhante à da β -glucana extraída de *P. insidiosum*.

Com a finalidade de conhecer o potencial imunomodulador da β -glucana extraída de *P. insidiosum*, realizamos o teste de proliferação de linfócitos *in vitro* com linfócitos extraídos de humanos, equinos e camundongos (manuscrito 2). O uso de linfócitos de humanos e equinos objetivou a observação direta do potencial dessa β -glucana em células das principais espécies afetadas pela pitiose. Nós observamos que a β -glucana aumentou significativamente a proliferação de linfócitos de todas as espécies testadas, demonstrando assim habilidade de

melhorar a imunidade celular, além de não apresentar efeito tóxico sobre as células. Sequencialmente, o potencial de induzir resposta imune do tipo T *in vivo* em camundongos foi avaliado através da quantificação de citocinas induzidas pela imunização dos animais com diferentes concentrações de β -glucana. O perfil de citocinas observado indica a promoção de uma resposta imune do tipo Th17, a qual está relacionada com a cura e com vacinas efetivas contra infecções fúngicas (Huang *et al.*, 2010; Wuthrich *et al.*, 2011).

Os coelhos são os animais utilizados como modelo experimental em pitiose, uma vez que são considerados os únicos animais suscetíveis a infecção experimental (Santurio *et al.*, 2003; Gaastra *et al.*, 2010). Recentemente, Zanette *et al.* (2013d) descreveram um modelo de infecção em *Drosophila melanogaster* Toll-deficiente. Embora os modelos com coelhos sejam bastante úteis para o estudo de infecções fúngicas e seu tratamento, eles são mais caros para comprar, sua criação exige instalações especiais e acompanhamento cuidadoso, e mais importante, há poucos reagentes imunológicos e moleculares disponíveis (Capilla *et al.*, 2007).

Uma vez que camundongos são naturalmente resistentes a pitiose experimental (dados pessoais), nós testamos no manuscrito 3 dois protocolos de imunossupressão na tentativa de estabelecer a infecção: i) uma dose de ciclofosfamida 150 mg/Kg, intraperitoneal (i.p.), 24 horas antes da inoculação (Cenci *et al.*, 2000); ii) associação de uma dose de ciclofosfamida 150 mg/Kg, i.p. e uma dose de hidrocortisona acetato 250 mg/Kg, subcutânea, 72 e 24 horas antes da inoculação, respectivamente (Sheppard *et al.*, 2004). O segundo protocolo produziu uma mortalidade de 60% e foi escolhido para os estudos subsequentes.

A imunossupressão dos animais antes do desafio com os zoósporos de *P. insidiosum* mostrou ser uma estratégia eficaz para o estabelecimento da infecção experimental, uma vez que a partir de 48 horas após a inoculação os animais começaram a sucumbir à doença e a mortalidade atingiu 60% no nono dia pós-infecção, mantendo-se estável até o final do experimento. Durante o experimento alguns sinais clínicos foram observados, tais como,

dificuldade respiratória, letargia e paralisa dos membros inferiores. As lesões ulcerativas subcutâneas comumente observadas nos coelhos experimentalmente infectados e em animais naturalmente infectados, não foram observadas. A avaliação histopatológica mostrou um quadro de trombose vascular aguda, com a presença de hifas e sinais de necrose nos rins e/ou fígado de 60% dos animais. Os animais que sobreviveram ao período do experimento (14 dias) e foram eutanasiados no final, apresentaram uma área enegrecida no local da inoculação dos zoósporos e a análise histopatológica detectou a presença de hifas com infiltrado neutrofílico e necrose na pele de seis dos oito animais sobreviventes. A detecção de hifas pela análise histopatológica em rim, fígado e pele, quando somadas atingiram 75% dos animais infectados.

A avaliação das citocinas produzidas durante a infecção experimental nos camundongos mostrou uma grande secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, IL-6, TNF- α e IL-10, respectivamente. As citocinas de resposta Th1 (INF- γ) e Th17 (IL-17) que são relacionadas a cura de infecções fúngicas (Huang *et al.*, 2010), não foram detectadas no sobrenadante do cultivo dos linfócitos dos animais infectados. Inesperado foi a ausência de IL-4, uma citocina relacionada a respostas do tipo Th2 e associada a instalação e progressão da pitiose em humanos e animais (Wanachiwanawin *et al.*, 2004; Mendoza e Newton, 2005).

A IL-10 é uma importante citocina que afeta o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 durante as infecções fúngicas. Essa interleucina é considerada a principal citocina imunorregulatória, influenciando o desenvolvimentos das células T bem como a produção de várias citocinas pró-inflamatórias (Cyktor e Turner, 2011). Altos níveis de IL-10 regulam negativamente a secreção de INF- γ e são detectadas nos casos de candidíase mucocutânea crônica, onde a resposta Th1 é bloqueada sem o aumento de resposta Th2, evidenciando a supressão do sistema imune pela IL-10 favorecendo a persistência da infecção (Lilic, 2002; Romani, 2011).

Trabalhos anteriores que avaliaram a patogênese da aspergilose pulmonar invasiva em um modelo de camundongos imunossuprimidos quimicamente, também encontraram a expressão de altos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α e IL-10) e associaram o aumento na mortalidade e a patogênese da doença aos altos níveis de IL-10 encontrados (Balloy *et al.*, 2005; Lewis e Kontoyiannis, 2009). A ação da IL-10 resulta em supressão das principais proteínas e moléculas co-estimulatórias do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II) sobre a superfície de macrófagos, além de diminuir a produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio liberadas durante a ativação dos macrófagos. Portanto, a IL-10 diminui a capacidade das células do sistema imune inato de erradicar patógenos, bem como reduz sua capacidade de gerar e manter uma resposta de células T antígeno-específica (Cyktor e Turner, 2011).

Em um estudo recente com o oomiceto *Saprolegnia parasitica*, que causa infecção em peixes, observou-se uma forte indução de citocinas pró-inflamatórias desencadeadas por componentes da parede celular de *S. parasitica* além da supressão imunitária da maioria dos genes relacionados com as citocinas associadas as respostas Th, o que comprometeu as respostas Th1 e Th2 nos animais infectados. Eles concluíram que a supressão ativa da imunidade adaptativa dos peixes durante a infecção é a responsável pela falha do sistema imunológico em responder adequadamente a infecção e está relacionada aos componentes da parede celular e a produção e secreção de prostaglandina E2 pelo patógeno (Belmonte *et al.*, 2014). Até então, a supressão da resposta imunológica em hospedeiros vertebrados durante a infecção por oomicetos havia sido previamente sugerida (Alvarez *et al.*, 1995; Kales *et al.*, 2007; Fregeneda-Grandes *et al.*, 2009), porém não claramente comprovada *in vivo*.

A resposta imune do hospedeiro naturalmente afetado pela pitiose é descrita como sendo uma resposta Th2, caracterizada por inflamação eosinofílica e secreção de IL4 e IL-5 (Mendoza e Newton, 2005). As células Th2 são secretoras de IL-10, porém vários tipos de células são

capazes de secretar IL-10, principalmente as células T regulatórias, portanto, a secreção dessa citocina no início da infecção não pode ser utilizada como marcador da ativação de resposta Th2 (Romani e Puccetti, 2006). Além disso, a ausência da produção de IL-4 observada em nosso estudo dificulta a ligação do desenvolvimento da infecção a uma típica resposta Th2.

8 CONCLUSÃO

- A avaliação da suscetibilidade *in vitro* de *Conidiobolus lamprauges* frente aos antifúngicos individualmente testados mostrou um perfil geral de resistência ou suscetibilidade reduzida, tendo apenas a terbinafina ($CIM < 0,06\text{--}0,5 \mu\text{g/mL}$) demonstrado potencial de uso terapêutico.

- A avaliação da combinação do sulfametoxzol com a trimetoprima demonstrou 100% de interações sinérgicas frente a *C. lamprauges*. A terbinafina, quando associada com os antifúngicos azólicos (miconazol, posaconazol e voriconazol) resultou em 71% de interações sinérgicas. A associação sulfametoxzol + trimetoprima com os fármacos antifúngicos avaliados apresentou 100% de interações indiferentes.

- O uso da técnica de disco difusão com discos de minociclina mostrou-se uma ferramenta útil para a identificação presuntiva de *Pythium insidiosum* bem como para sua diferenciação de *C. lamprauges* e outros fungos verdadeiros.

- A quantificação enzimática do conteúdo de β -glucanas presente no micélio de isolados clínicos de *P. insidiosum* mostrou uma quantidade significativa desse carboidrato quando comparado a outros fungos (média \pm DP: $23,06 \pm 3,55$ de glucana total, $3,82 \pm 0,91$ de α -glucana e $19,24 \pm 3,57$ β -glucan).

- A extração de β -glucanas do micélio de *P. insidiosum* gerou um extrato com conteúdo de 82% de β -glucanas e 18% de aminoácidos e peptídeos residuais. A análise estrutural evidenciou tratar-se de uma β -glucana com cadeia principal do tipo β -(1,3) com ramificações do tipo β -(1,6) a cada 1-2 unidades da cadeia principal;

- A avaliação do potencial imunomodulador *ex vivo* em linfócitos de camundongos BALB/c imunizados com diferentes concentrações de (1,3)(1,6)- β -D-glucana mostrou um perfil de citocinas compatível com a indução de uma resposta imunológica do tipo Th17;

- O uso de camundongos BALB/c quimicamente imunossuprimidos (associação de ciclofosfamida e hidrocortisona) demonstrou ser um bom modelo experimental para o estudo da pitiose. A mortalidade dos animais infectados atingiu 60% e a invasão de órgãos internos (rim e fígado) por *P. insidiosum* foi confirmada através de imuno-histoquímica;

- A dosagem de citocinas do sobrenadante do cultivo de linfócitos extraídos dos camundongos infectados com *P. insidiosum* mostrou altos níveis de secreção de IL-6, IL-10 e TNF- α , indicando uma subversão da resposta imune do hospedeiro, provavelmente induzida por componentes da parede celular ou por exoantígenos liberados durante a infecção.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S.; MESHRAM, P.; QAZI, M. S. Rhinoentomophthoromycosis: A rare case report. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 401-414, 2013.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4th. New York: Wiley, 1996. 868 p.
- ALVAREZ, F. et al. Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 47, n. 1-2, p. 163-172, 1995.
- ANDRADE, Z. A. et al. Nasal granuloma caused by *Entomophthora coronata*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 16, n. 1, p. 31-33, 1967.
- ARGENTA, J. S. et al. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol.**, v. 157, n. 1-2, p. 137-142, 2012.
- ARGENTA, J. S. et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 2, p. 767-769, 2008.
- ARONSON, J. M.; COOPER, B. A.; FULLER, M. S. Glucans of oomycete cell walls. **Science**, v. 155, n. 3760, p. 332-335, 1967.
- ASCUNCE, M. S. et al. Whole genome sequence of the emerging oomycete pathogen *Pythium insidiosum* strain CDC-B5653 isolated from an infected human in the USA. **Genomics Data**, v. 7, n. s/n, p. 60-61, 2016.
- BACH, B. C. et al. E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. **Cell Biochem. Funct.**, v. 31, n. 6, p. 476-481, 2013.
- BACH, B. C. et al. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. **Biomed. Pharmacother.**, v. 64, n. 10, p. 718-722, 2010.
- BADENOCH, P. R. et al. *Pythium insidiosum* keratitis confirmed by DNA sequence analysis. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 4, p. 502-503, 2001.
- BALLOY, V. et al. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 1, p. 494-503, 2005.
- BAR, E. et al. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 117-127, 2014.
- BARDALAYE, P. C.; NORDIN, J. H. Chemical structure of the galactomannan from the cell wall of *Aspergillus niger*. **J. Biol. Chem.**, v. 252, n. 8, p. 2584-2591, 1977.

BAREQUET, I. S.; LAVINSKY, F.; ROSNER, M. Long-term follow-up after successful treatment of *Pythium insidiosum* keratitis in Israel. **Semin. Ophthalmol.**, v. 28, n. 4, p. 247-250, 2013.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 22, n. 1, p. 87-108, 1968.

BATBAYAR, S.; LEE, D. H.; KIM, H. W. Immunomodulation of fungal beta-glucan in host defense signaling by dectin-1. **Biomol. Ther.**, v. 20, n. 5, p. 433-445, 2012.

BEAKES, G. W.; GLOCKLING, S. L.; SEKIMOTO, S. The evolutionary phylogeny of the oomycete "fungi". **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 3-19, 2012.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, n. s/n, p. 551-589, 2009.

BELMONTE, R. et al. Role of pathogen-derived cell wall carbohydrates and prostaglandin E2 in immune response and suppression of fish immunity by the oomycete *Saprolegnia parasitica*. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 11, p. 4518-4529, 2014.

BENTO, D. P. et al. Atypical presentation of entomophthoromycosis caused by *Conidiobolus coronatus*. **Med. Mycol.**, v. 48, n. 8, p. 1099-1104, 2010.

BERNARD, M.; LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. **Med. Mycol.**, v. 39 Suppl 1, n. 1, p. 9-17, 2001.

BERNARDO, F. D. et al. Pythiosis in sheep from Parana, southern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 6, p. 513-517, 2015.

BITTENCOURT, A. L.; MARBACK, R.; NOSSA, L. M. Mucocutaneous entomophthoramycosis acquired by conjunctival inoculation of the fungus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 5, p. 936-938, 2006.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 125, n. 1-2, p. 47-70, 2008.

BLASCHEK, W. et al. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell-wall (1→ 3),(1→ 6)- β -d-glucans. **Carbohydr. Res.**, v. 231, n. s/n, p. 293-307, 1992.

BOABAID, F. M. et al. Conidiobolomicose em ovinos no Estado de Mato Grosso. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, n. 1, p. 77-81, 2008.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1->3)-beta-D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.

BOSCO, S. D. G. et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.

BOTTON, S. A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Curr. Microbiol.**, v. 62, n. 4, p. 1225-1229, 2011.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAS, G. et al. A case of phycomycosis observed in Jamaica: Infection with *Entomophthora coronata*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 14, n. 1, p. 141-145, 1965.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 4, p. 471-479, 2005.

BUSAPAKUM, R. et al. Disseminated infection with *Conidiobolus incongruus*. **Med. Mycol.**, v. 21, n. 4, p. 323-330, 1983.

BUYSENS, S. et al. Involvement of pyochelin and pyoverdin in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 865-871, 1996.

CABIB, E. Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both β (1-6)-and β (1-3) glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Eukaryot. Cell**, v. 8, n. 11, p. 1626-1636, 2009.

CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 10, p. 3710-3713, 2011.

CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 16, n. 6, p. 567-571, 2004.

CAPILLA, J.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Animal models: an important tool in mycology. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 8, p. 657-684, 2007.

CARRERA, M. V. et al. Pythiosis in sheep from Pernambuco and Bahia States, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 4, p. 476-482, 2013.

CARRIGAN, M. J.; SMALL, A. C.; PERRY, G. H. Ovine nasal zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus*. **Aust. Vet. J.**, v. 69, n. 10, p. 237-240, 1992.

CAVALHEIRO, A. S. et al. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 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*. **Vet. Microbiol.**, v. 137, n. 3-4, p. 408-411, 2009b.

- CENCI, E. et al. T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. **J. Immunol.**, v. 165, n. 1, p. 381-388, 2000.
- CEYHAN, A. M. et al. Protective effects of beta-glucan against oxidative injury induced by 2.45-GHz electromagnetic radiation in the skin tissue of rats. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 304, n. 7, p. 521-527, 2012.
- CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 76, n. 1, p. 42-45, 2013.
- CHEMA, B. et al. Structural characterization, technological functionality and physiological aspects of fungal beta-D-glucans: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. In press, 2015.
- CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1-->3), (1-->6)-glucans. **Mycol. Res.**, v. 111, n. Pt 6, p. 635-652, 2007.
- CHERIAN, L. M. et al. Nasal conidiobolomycosis: A successful treatment option for localized disease. **J. Postgrad. Med.**, v. 61, n. 2, p. 143-144, 2015.
- CHINDAMPORN, A. et al. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 3, p. 330-336, 2009.
- CHOWDHARY, A. et al. Rhinoentomophthoromycosis due to *Conidiobolus coronatus*. A case report and an overview of the disease in India. **Med. Mycol.**, v. 48, n. 6, p. 870-879, 2010.
- CLEMONS, K. V. et al. Whole glucan particles as a vaccine against systemic coccidioidomycosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, n. 10, p. 1237-1243, 2015.
- CLEMONS, K. V. et al. Whole glucan particles as a vaccine against murine aspergillosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 63, n. 12, p. 1750-1759, 2014.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A2**. 2nd. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. x, 35 p.
- COSTA, A. R. et al. Rhinofacial zygomycosis caused by *Conidiobolus coronatus*. **Mycopathologia**, v. 115, n. 1, p. 1-8, 1991.
- CYKTOR, J. C.; TURNER, J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 8, p. 2964-2973, 2011.
- DE CASTRO, L. G. et al. Entomoftoromicose rinofacial por *Conidiobolus coronatus*: registro de um caso tratado com sucesso pelo fluconazol. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 34, n. 5, p. 483-487, 1992.

DE PAULA, D. A. J. et al. Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 22, n. 2, p. 274-277, 2010.

DESLANDES, Y.; MARCHESSAULT, R.; SARKO, A. Triple-helical structure of (1→ 3)- β -d-glucan. **Macromolecules**, v. 13, n. 6, p. 1466-1471, 1980.

DIXON, D. M. et al. Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. **Med. Mycol.**, v. 36, n. s/n, p. 57-67, 1998.

DO CARMO, P. M. S. et al. Cutaneous pythiosis in a goat. **J. Comp. Pathol.**, v. 152, n. 2-3, p. 103-105, 2015.

DORIA, R. G. S. et al. Evaluation of intravenous regional perfusion with amphotericin B and dimethylsulfoxide to treat horses for pythiosis of a limb. **BMC Vet. Res.**, v. 11, n. 1, p. 152, 2015.

DORIA, R. G. S. et al. Immunohistochemistry analysis to confirm cases of cutaneous pythiosis in horses diagnosed by means of clinic characterization and histopathologic evaluation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 66, n. 1, p. 27-33, 2014.

DOS SANTOS, C. E. P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian Pantanal and nearby areas: results of 76 cases. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 34, n. 2, p. 270-274, 2014.

DU, B. et al. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 41, n. 1, p. 49-59, 2015.

DYCUS, D. L.; FISHER, C.; BUTLER, R. Surgical and medical treatment of pyloric and duodenal pythiosis in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 51, n. 6, p. 385-391, 2015.

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

FARMER, A. R. et al. Combat-Related *Pythium aphanidermatum* invasive wound infection: case report and discussion of utility of molecular diagnostics. **J. Clin. Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 1968-1975, 2015.

FISCHER, N. et al. Rhinofacial *Conidiobolus coronatus* infection presenting with nasal enlargement. **Infection**, v. 36, n. 6, p. 594-596, 2008.

FONSECA, A. O. D. et al. In vitro reproduction of the life cycle of *Pythium insidiosum* from kunkers' equine and their role in the epidemiology of pythiosis. **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2, p. 123-127, 2014.

FONSECA, A. O. S. et al. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Vet. Microbiol.**, v. 178, n. 3-4, p. 265-269, 2015a.

FONSECA, A. O. S. et al. *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some Lamiaceae family species. **Mycopathologia**, v. 179, n. 3-4, p. 253-258, 2015b.

- FOSS, N. et al. Entomophthoramycosis: therapeutic success by using amphotericin B and terbinafine. **Dermatology**, v. 193, n. 3, p. 258-260, 1996.
- FREGENEDA-GRANDES, J. M.; CARBAJAL-GONZALEZ, M. T.; ALLER-GANCEDO, J. M. Prevalence of serum antibodies against *Saprolegnia parasitica* in wild and farmed brown trout *Salmo trutta*. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 83, n. 1, p. 17-22, 2009.
- FREIMUND, S. et al. A new non-degrading isolation process for 1,3-beta-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydr. Polym.**, v. 54, n. 2, p. 159-171, 2003.
- FRENCH, R.; ASHWORTH, C. Zygomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a llama (*Lama glama*). **Vet. Pathol. Online**, v. 31, n. 1, p. 120-122, 1994.
- FUJIMORI, M. et al. *Pythium insidiosum* colitis in a dog: treatment and clinical outcome. **Cienc. Rural**, v. 46, n. 3, p. 526-529, 2016.
- FURLAN, F. et al. Conidiobolomicose causada por *Conidiobolus lamprauges* em ovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 7, p. 529-532, 2010.
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Vet. Microbiol.**, v. 146, n. 1-2, p. 1-16, 2010.
- GABRIEL, A. L. et al. Outbreak of cutaneous pythiosis in cattle. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, n. 12, p. 583-587, 2008.
- GALIZA, G. J. N. et al. Occurrence of mycoses and pythiosis in domestic animals: 230 cases. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 3, p. 224-232, 2014.
- GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 26, n. s/n, p. 162-173, 2014.
- GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. **Immunol. Rev.**, v. 230, n. 1, p. 38-50, 2009.
- GRECCO, F. B. et al. Cutaneous pythiosis in cattle in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 11, p. 938-942, 2009.
- GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.
- GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **J. Vet. Intern. Med.**, 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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 14, n. 4, p. 288-294, 2002.

GUARRO, J.; AGUILAR, C.; PUJOL, I. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* spp. strains. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, n. 4, p. 557-560, 1999.

GUGNANI, H. C. Entomophthoromycosis due to *Conidiobolus*. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 8, n. 3, p. 391-396, 1992.

GUPTA, M. et al. A prospective case series evaluating efficacy and safety of combination of itraconazole and potassium iodide in rhinofacial conidiobolomycosis. **Int. J. Dermatol.**, v. 55, n. 2, p. 208-214, 2016.

HAHTAPORNSAWAN, S. et al. Suprainguinal vascular pythiosis: effective long-term outcome of aggressive surgical eradication. **Ann. Vasc. Surg.**, v. 28, n. 7, p. 1797-e1791, 2014.

HAWKINS, E. C. et al. Treatment of *Conidiobolus* sp. pneumonia with itraconazole in a dog receiving immunosuppressive therapy. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 20, n. 6, p. 1479-1482, 2006.

HEATH, J. A. et al. *Pythium insidiosum* pleuropericarditis complicating pneumonia in a child with leukemia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, n. 6, p. E60-E64, 2002.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol. Res.**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HUANG, H. B. et al. Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan particles. **Mbio**, v. 1, n. 3, p. e00164-00110, 2010.

HUMBER, R.; BROWN, C.; KORNEGAY, R. Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 3, p. 573-576, 1989.

HUMBER, R. A. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**, v. 120, n. 1, p. 477-492, 2012.

HUNG, C.; LEDDIN, D. Keratitis caused by *Pythium insidiosum* in an immunosuppressed patient with Crohn's Disease. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 12, n. 10, p. A21-A22, 2014.

IBRAHIM, A. S. et al. Deferiprone iron chelation as a novel therapy for experimental mucormycosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, n. 5, p. 1070-1073, 2006.

IBRAHIM, A. S. et al. Mucormycosis and entomophthoramycosis (zygomycosis). In: KAUFFMAN, C. A.; PAPPAS, P. G., et al (Ed.). **Essentials of clinical mycology**. 2nd. New York: Springer, 2011. p.265-280.

INKOMLUE, R. et al. Development of an anti-elicitin antibody-based immunohistochemical assay for diagnosis of pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 43-48, 2016.

JAFFEY, P. et al. Disseminated *Conidiobolus* infection with endocarditis in a cocaine abuser. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 114, n. 12, p. 1276-1278, 1990.

JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *pythium insidiosum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 9, p. 5621-5625, 2014.

- JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin, or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 1, p. 87-91, 2016.
- JIANG, R. H. et al. Ancient origin of elicitin gene clusters in *Phytophthora* genomes. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 2, p. 338-351, 2006.
- JOHNSTON, M. J. et al. Ficomicose em muar. Isolamento de *Entomophthora coronata*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 34, n. s/n, p. 51-58, 1967.
- KALES, S. C. et al. Response of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line, RTS11 to the water molds *Achlya* and *Saprolegnia*. **Mol. Immunol.**, v. 44, n. 9, p. 2303-2314, 2007.
- KAUFMAN, L.; MENDOZA, L.; STANDARD, P. G. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 9, p. 1887-1890, 1990.
- KEERATIJARUT, A. et al. The Immunoreactive Exo-1,3-beta-glucanase from the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* is temperature regulated and exhibits glycoside hydrolase activity. **PLoS One**, v. 10, n. 8, 2015a.
- KEERATIJARUT, A. et al. PCR amplification of a putative gene for exo-1,3-beta-glucanase to identify the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Asian Biomed.**, v. 8, n. 5, p. 637-644, 2014.
- KEERATIJARUT, A. et al. Detection of the oomycete *Pythium insidiosum* by real-time PCR targeting the gene coding for exo-1,3-beta-glucanase. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, n. 9, p. 971-977, 2015b.
- KEERATIJARUT, A. et al. A peptide ELISA to detect antibodies against *Pythium insidiosum* based on predicted antigenic determinants of exo-1,3-beta-glucanase. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 44, n. 4, p. 672-680, 2013.
- KIMURA, M. et al. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprauges*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 2, p. 752-756, 2011.
- KIRKPATRICK, W. R. et al. Animal models in mycology: what have we learned over the past 30 years. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 68-78, 2012.
- KOLLAR, R. et al. Architecture of the yeast cell wall, $\beta(1-6)$ glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1-3)$ -glucan, and chitin. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 28, p. 17762-17775, 1997.
- KOSRIRUKVONGS, P. et al. Evaluation of Nested PCR technique for detection of *Pythium Insidiosum* in pathological specimens from patients with suspected fungal keratitis. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 45, n. 1, p. 167-173, 2014.
- KRAJAEJUN, T. et al. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clin. Vaccine Immunol.**, 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. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 2, p. 378-382, 2002.

KRAJAEJUN, T. et al. Identification of a novel 74-kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 1674-1680, 2006a.

KRAJAEJUN, T. et al. Transcriptome analysis reveals pathogenicity and evolutionary history of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Fungal Biol.**, v. 118, n. 7, p. 640-653, 2014.

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

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

KYANKO, M. V. et al. β-Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 49, n. 1, p. 41-45, 2013.

LEAL, A. T. et al. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum* antigens. **J. Mycol. Med.**, v. 15, n. 2, p. 63-68, 2005.

LELIEVRE, L. et al. Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 2, p. 270-273, 2015.

LERKSUTHIRAT, T. et al. The elicitin-like glycoprotein, ELI025, is secreted by the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* and evades host antibody responses. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015a.

LERKSUTHIRAT, T. et al. Geographic variation in the elicitin-like glycoprotein, ELI025, of *Pythium insidiosum* isolated from human and animal subjects. **Infect. Genet. Evol.**, v. 35, n. s/n, p. 127-133, 2015b.

LEVITZ, S. M. Innate recognition of fungal cell walls. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 4, p. e1000758, 2010.

LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Invasive aspergillosis in glucocorticoid-treated patients. **Med. Mycol.**, v. 47, n. sup1, p. S271-S281, 2009.

LILIC, D. New perspectives on the immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 15, n. 2, p. 143-147, 2002.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LIU, X. Y. et al. A new isolation method of beta-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Hydrocolloid.**, v. 22, n. 2, p. 239-247, 2008.

- LORETO, E. S. et al. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol.**, v. 156, n. 1-2, p. 222-226, 2012.
- LORETO, E. S. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 7, p. 3588-3590, 2011.
- LORETO, E. S. et al. New insights into the *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 12, p. 7534-7537, 2014.
- LOWMAN, D. W. et al. New insights into the structure of (1→3,1→6)- β -D-glucan side chains in the *Candida glabrata* cell wall. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27614, 2011.
- MACDONALD, E. et al. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genet. Biol.**, v. 37, n. 3, p. 245-249, 2002.
- MACKEY, P. E. et al. Disseminated *Conidiobolus incongruus* in a dog: A case report and literature review. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 8, n. s/n, p. 24-28, 2015.
- MADSON, D. M. et al. Systemic *Conidiobolus incongruus* infection and hypertrophic osteopathy in a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 21, n. 1, p. 167-170, 2009.
- MAHL, D. L. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 7, p. 4021-4023, 2012.
- MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Equine diseases in Southern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 3, p. 205-210, 2014.
- MARTINS, T. B. et al. A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. **J. Comp. Pathol.**, v. 146, n. 2-3, p. 122-131, 2012.
- MEDWAY, W. Some bacterial and mycotic diseases of marine mammals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 177, n. 9, p. 831-834, 1980.
- MELIDA, H. et al. Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types. **Eukaryot. Cell**, v. 12, n. 2, p. 194-203, 2013.
- MENDOZA, L. Pythiosis. In: TOPLEY, W. W. C.; WILSON, G. S. S., et al (Ed.). **Topley & Wilson's microbiology & microbial infections**. 10th ed. London: Hodder Arnold, 2005. p.1-18.
- MENDOZA, L. *Pythium insidiosum* and mammalian hosts. In: LAMOUR, K. e KAMOUN, S. (Ed.). **Oomycete Genetics and Genomics : Diversity, Interactions and Research Tools**. 1 ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2009. cap. 19, p.387-405.
- MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Mycol. Med.**, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.
- MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.

MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2797-2804, 2003.

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

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

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. et al. Description of three novel *Lagenidium* (Oomycota) species causing infection in mammals. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. In Press, 2016.

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

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 7, n. 3, p. 198-208, 2013.

MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. **Mycopathologia**, v. 119, n. 2, p. 89-95, 1992b.

MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Aust. Vet. J.**, v. 57, n. 8, p. 377-382, 1981.

MILLER, R. I. Equine Phycomycosis. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 5, n. 9, p. S472-S477, 1983a.

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

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Immunological studies on equine phycomycosis. **Aust. Vet. J.**, v. 58, n. 6, p. 226-231, 1982.

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**, v. 21, n. 4, p. 331-341, 1983.

MINARI, M. C. et al. Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1. **Acta Virol.**, v. 55, n. 3, p. 255-259, 2011.

MONTEIRO, A. B. **Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo Pythium insidiosum**.

1999. 52 (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

MOORE, M. H.; MURPHY, D.; JAMES, C. Nasofacial phycomycosis: persistence pays. **J. Craniofac. Surg.**, v. 18, n. 2, p. 448-450, 2007.

MORAES, A. S. et al. Pitium-Vac® – Imunoterápico contra Pitiose Equina. **Impactos Econômicos, Sociais e Ambientais deTecnologias da Embrapa Pantanal**, Corumbá, 2013. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC123.pdf>>. Acesso em: 29 Jun.

MORAES, M. A. et al. Zigomicose nasofacial: relato de um caso do estado do Pará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 36, n. 2, p. 171-174, 1994.

MORRISON, V. A. Echinocandin antifungals: review and update. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 4, n. 2, p. 325-342, 2006.

MURDOCH, D.; PARR, D. *Pythium insidiosum* keratitis. **Aust. N. Z. J. Ophthalmol.**, v. 25, n. 2, p. 177-179, 1997.

NOVAESLE.M; JIMENEZM.A; VILLANUE.JR. Chemical composition of hyphal wall of phycomycetes. **J. Gen. Microbiol.**, v. 47, n. 2, p. 237-245, 1967.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Beta-glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **J. Immunotoxicol.**, v. 5, n. 1, p. 47-57, 2008.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. **Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets**, v. 9, n. 1, p. 67-75, 2009.

OLDENHOFF, W. et al. Cutaneous pythiosis in two dogs from Wisconsin, USA. **Vet. Dermatol.**, v. 25, n. 1, p. 52-e21, 2014.

ORLEAN, P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 775-818, 2012.

PEDROSO, P. M. O. et al. Rinite micótica rinofaríngea em um ovino Textel no Rio Grande do Sul. **Acta Sci. Vet.**, v. 37, n. 2, p. 181-185, 2009.

PEREIRA, D. I. B. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of *Pythium insidiosum*: comparison study between caspofungin acetate and immunotherapy in experimental pythiosis in rabbits. **Acta Sci. Vet.**, v. 36, n. 1, p. 75-75, 2008.

PEREIRA, D. I. B. et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3-4, p. 309-315, 2013.

PEREIRA, D. I. B. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, n. 5, p. 1168-1171, 2007.

PEREIRA, D. I. B. et al. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. **J. Mycol. Med.**, v. 18, n. 3, p. 129-133, 2008.

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

PERMPALUNG, N. et al. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 70, n. 6, p. 1885-1892, 2015.

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

PESSOA, A. F. A. et al. Skin disease of equidae in the Brazilian semiarid region. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 8, p. 743-748, 2014.

PHILLIPS, A. J. et al. New insights into animal pathogenic oomycetes. **Trends Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2008.

PIRES, L. et al. Photodynamic Therapy in *Pythium insidiosum* - An *in vitro* study of the correlation of sensitizer localization and cell death. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85431, 2014.

PIRES, L. et al. Photodynamic therapy for pythiosis. **Vet. Dermatol.**, v. 24, n. 1, p. 130-e130, 2013.

POOLE, H. M.; BRASHIER, M. K. Equine cutaneous pythiosis. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 25, n. 3, p. 229-235, 2003.

PRESSER, J. W.; GOSS, E. M. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. **Med. Mycol.**, v. 53, n. 7, p. 674-683, 2015.

PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 3, p. 517-518, 2006.

QI, C. J. et al. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived beta-glucans. **Blood**, v. 117, n. 25, p. 6825-6836, 2011.

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

REANPANG, T. et al. Vascular pythiosis of the lower extremity in northern Thailand: Ten years' experience. **Int. J. Low. Extr. Wounds**, v. 14, n. 3, p. 245-250, 2015.

REISS, E.; SHADOMY, H. J.; LYON, G. M. Entomophthoramycosis caused by *Conidiobolus* species. In: REISS, E.; SHADOMY, H. J., et al (Ed.). **Fundamental Medical Mycology**. 1st. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2012. cap. 17C, p.467-474.

RESTREPO, A. Treatment of tropical mycoses. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, n. 3, p. S91-S102, 1994.

- RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 2, p. 236-301, 2000.
- RIET-CORREA, F. et al. Outbreaks of rhinofacial and rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraíba, northeastern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, n. 1, p. 29-35, 2008.
- ROBINSON, C. et al. Treatment of a mare for *Conidiobolus coronatus* infection. **Equine Vet. Educ.**, v. 19, n. 8, p. 396-403, 2007.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, n. 4, p. 275-288, 2011.
- ROMANI, L.; PUCCETTI, P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 4, p. 183-189, 2006.
- ROY, A. Rhinophycomycosis entomophthorae occurring in a chimpanzee in the wild in East Africa: further report. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, n. 5, p. 935-935, 1974.
- SALIPANTE, S. J. et al. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection by use of PCR screening and DNA sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 1480-1483, 2012.
- SANTOS, C. E. P. et al. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 18, n. 8, p. 1397-1399, 2011.
- SANTOS, M. N.; LONDERO, A. T. Zigomicose subcutânea em cavalos. **Pesq. Agro. Bras.**, v. 9, n. s/n, p. 7-8, 1974.
- SANTURIO, J. M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Vet. Rec.**, v. 163, n. 9, p. 276-277, 2008.
- 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 immunotherapics against pythiosis insidiosi developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2535-2540, 2003.
- SANTURIO, J. M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosi 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. **J. Infect. Dis.**, v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.
- SCHLOSSER, E.; GOTTLIEB, D. Sterols and the sensitivity of *Pythium* species to filipin. **J. Bacteriol.**, v. 91, n. 3, p. 1080-1084, 1966.
- SCHMIEDT, C. W. et al. Treatment of intestinal pythiosis in a dog with a combination of marginal excision, chemotherapy, and immunotherapy. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 241, n. 3, p. 358-363, 2012.

- SCHURKO, A. M. et al. Development of a species-specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 6, p. 2411-2418, 2004.
- SHARMA, N.; MAHAJAN, V.; SINGH, P. Orofacial conidiobolomycosis due to *Conidiobolus incongruus*. **Mycoses**, v. 46, n. 3-4, p. 137-140, 2003.
- SHENEP, J. L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.
- SHEPPARD, D. C. et al. Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 5, p. 1908-1911, 2004.
- SHIPTON, W. A.; MILLER, R. I.; LEA, I. R. Cell-wall, zoospore and morphological characteristics of australian isolates of a *Pythium* causing equine phycomycosis. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 79, n. Aug, p. 15-23, 1982.
- SIETSMA, J.; EVELEIGH, D.; HASKINS, R. Cell wall composition and protoplast formation of some oomycete species. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 184, n. 2, p. 306-317, 1969.
- SILVA, M. C. et al. Immunoreactive proteins of *Conidiobolus lamprauges* isolated from naturally infected sheep. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 4, p. 344-348, 2015.
- SILVA, S. et al. Conidiobolomycosis in sheep in Brazil. **Vet. Pathol. Online**, v. 44, n. 3, p. 314-319, 2007a.
- SILVA, S. M. et al. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, n. 4, p. 184-190, 2007b.
- SILVEIRA, M. M. et al. Development and application of polymerase chain reaction test for detection of *Conidiobolus lamprauges*. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 12, p. 1448-1452, 2013.
- SPELLBERG, B. et al. The deferasirox-AmBisome therapy for mucormycosis (DEFEAT Mucor) study: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, n. 3, p. 715-722, 2012.
- SRIPHANA, U. et al. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia**, v. 91, n. s/n, p. 39-43, 2013a.
- SRIPHANA, U. et al. Clauraila E from the roots of *Clausena harmandiana* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 36, n. 9, p. 1078-1083, 2013b.
- STEELE, C.; WORMLEY, F. L. Immunology of fungal infections: Lessons learned from animal models. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 15, n. 4, p. 413-419, 2012.
- STIER, H.; EBBESKOTTE, V.; GRUENWALD, J. Immune-modulatory effects of dietary yeast beta-1,3/1,6-D-glucan. **Nutr. J.**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.
- SUDA, M. et al. Modulation of the antitumor effect and tissue distribution of highly branched (1-]3)-beta-D-glucan, ssg, by carrageenan. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, n. 5, p. 772-775, 1995.

- SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 1, p. 41-52, 2008.
- SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydr. Polym.**, v. 92, n. 1, p. 792-809, 2013.
- TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in Northeastern Brazil. **Vet. Pathol.**, v. 41, n. 4, p. 412-415, 2004.
- TADANO, T. et al. Entomoftoromicose (zigomicose) causada por *Conidiobolus coronatus* em Mato Grosso (Brasil): relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 2, p. 188-190, 2005.
- TANGPHATSORNRUANG, S. et al. Comparative mitochondrial genome analysis of *Pythium insidiosum* and related oomycete species provides new insights into genetic variation and phylogenetic relationships. **Gene**, v. 575, n. 1, p. 34-41, 2016.
- TEMPLE, M. E. et al. Periorbital cellulitis secondary to *Conidiobolus incongruus*. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 3, p. 351-354, 2001.
- THAKAR, A. et al. Rhinophycomycosis. **J. Laryngol. Otol.**, v. 115, n. 6, p. 493-496, 2001.
- THANATHANEE, O. et al. Outbreak of *Pythium* keratitis during rainy season: a case series. **Cornea**, v. 32, n. 2, p. 199-204, 2013.
- THIANPRASIT, M.; CHAIPRASERT, A.; IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis. **Curr. Top. Med. Mycol.**, 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*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, n. 6, p. 1394-1400, 1998.
- THOMAS, M. M. et al. Rhinoentomophthoromycosis. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, v. 72, n. 4, p. 296-299, 2006.
- THOMAS, R. C.; LEWIS, D. T. Pythiosis in dogs and cats. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 20, n. 1, p. 63-75, 1998.
- THONGSRI, Y. et al. Detection of diketopiperazine and pyrrolnitrin, compounds with anti-*Pythium insidiosum* activity, in a *Pseudomonas stutzeri* environmental strain. **Biomed. Pap.**, v. 158, n. 3, p. 378-383, 2014.
- THONGSRI, Y. et al. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* using a single-tube Nested PCR. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 369-376, 2013.
- TRISCOTT, J. A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **J. Cutan. Pathol.**, v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.

TWIZEYIMANA, E. et al. Rhinofacial conidiobolomycosis associated with cervical, thoracic and brachial localizations: one clinical case in Nigeria. **J. Mycol. Med.**, v. 24, n. 1, p. 48-55, 2014.

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

VALLE, A. C. et al. Entomophthoramycosis by *Conidiobolus coronatus*. Report of a case successfully treated with the combination of itraconazole and fluconazole. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 43, n. 4, p. 233-236, 2001.

VAN DE VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G. T-cell subsets and antifungal host defenses. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 4, n. 4, p. 238-243, 2010.

VANITTANAKOM, N. et al. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 3970-3974, 2004.

VANITTANAKOM, N. et al. Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, n. 3-4, p. 321-326, 2014.

VANNUCCI, L. et al. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). **Int. J. Oncol.**, v. 43, n. 2, p. 357-364, 2013.

VAZIRI-TEHRANI, B.; DICK, M. Neutral and amino sugars from the cell walls of Oomycetes. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 8, n. 2, p. 105-108, 1980.

VECCHIARELLI, A. et al. *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 3, n. 8, p. 997-1005, 2011.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World J. Clin. Oncol.**, v. 2, n. 2, p. 115-119, 2011.

VILELA, R. et al. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 427-432, 2010.

VILELA, R. et al. *Lagenidium giganteum* pathogenicity in mammals. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 21, n. 2, p. 290-297, 2015a.

VILELA, R.; VISWANATHAN, P.; MENDOZA, L. A. A biochemical screening approach to putatively differentiate mammalian pathogenic Oomycota species in the clinical laboratory. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, n. 8, p. 862-868, 2015b.

VIRGILE, R. et al. Human infectious corneal ulcer caused by *Pythium insidiosum*. **Cornea**, v. 12, n. 1, p. 81-83, 1993.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. **Physiol. Behav.**, v. 94, n. 2, p. 276-284, 2008.

- WALKER, S. D. et al. Fatal disseminated *Conidiobolus coronatus* infection in a renal transplant patient. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 98, n. 6, p. 559-564, 1992.
- WALSH, T. J. et al. Invasive zygomycosis due to *Conidiobolus incongruus*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 19, n. 3, p. 423-430, 1994.
- 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.
- WATANABE, M. J. et al. Equine pythiosis: Report of 28 cases from Sao Paulo State, Brazil. **Semin-Cienc. Agrar.**, v. 36, n. 2, p. 909-915, 2015.
- WAWRA, S. et al. Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 15, n. 6, p. 685-691, 2012.
- WEIBLEN, C. et al. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Cienc. Rural**, v. 46, n. 1, p. 126-131, 2016.
- WELLEHAN, J. F. X. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 35, n. 4, p. 564-568, 2004.
- WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, n. 3863, p. 150-160, 1969.
- WITKAMP, J. Bijdrage tot de kennis van *Hypomycosis destruens*: studie uit het Veeartsenkundig Laboratorium te Buitenzorg. **Ned. Ind. Blad voor Diergeneesk. en Dierenteelt**, v. 36, n. s/n, p. 229-245, 1924.
- WÜPPENHORST, N. et al. Rhino-orbitocerebral zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus* in an immunocompromised patient in Germany. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 11, p. 4322-4325, 2010.
- WUTHRICH, M.; DEEPE, G. S.; KLEIN, B. Adaptive Immunity to Fungi. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, n. s/n, p. 115-148, 2012.
- WUTHRICH, M. et al. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 2, p. 554-568, 2011.
- YANG, X. et al. Rhinofacial conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a chinese rice farmer. **Mycoses**, v. 53, n. 4, p. 369-373, 2010.
- YANGCO, B. et al. Comparative antigenic studies of species of *Basidiobolus* and other medically important fungi. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 679-682, 1986.
- YANGCO, B. G.; OKAFOR, J. I.; TESTRAKE, D. *In vitro* susceptibilities of human and wild-type isolates of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 25, n. 4, p. 413-416, 1984.

ZAK, O.; SANDE, M. A. **Handbook of animal models of infection : experimental models in antimicrobial chemotherapy.** 1 ed. San Diego: Academic Press, 1999. 1136 p.

ZANETTE, R. A. et al. Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, n. 5, p. 1144-1147, 2013a.

ZANETTE, R. A. et al. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. **Vet. Microbiol.**, v. 162, n. 2-4, p. 826-830, 2013b.

ZANETTE, R. A. et al. Complex interaction of deferasirox and *Pythium insidiosum*: Iron-dependent attenuation of growth *in vitro* and immunotherapy-like enhancement of immune responses *in vivo*. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015a.

ZANETTE, R. A. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to garlic extract. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 5, n. 29, p. 5316-5318, 2011.

ZANETTE, R. A. et al. Enzymatic variability among Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 30, n. 4, p. 264-266, 2013c.

ZANETTE, R. A. et al. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. **J. Mycol. Med.**, v. 25, n. 1, p. 91-94, 2015b.

ZANETTE, R. A. et al. Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiol. Immunol.**, v. 57, n. 10, p. 732-735, 2013d.

ZEKOVIC, D. B. et al. Natural and modified (1 -> 3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 25, n. 4, p. 205-230, 2005.