

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

Lara Baccarin Ianiski

**ATIVIDADE *in vitro* ANTI-*Pythium insidiosum* DO CLORIDRATO
DE AMOROLFINA E AZITROMICINA ISOLADAMENTE E EM
COMBINAÇÃO**

**Santa Maria, RS
2020**

Lara Baccarin Ianiski

ATIVIDADE *in vitro* ANTI-*Pythium insidiosum* DO CLORIDRATO DE AMOROLFINA E AZITROMICINA ISOLADAMENTE E EM COMBINAÇÃO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof. Dra. Sônia de Avila Botton

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Ianiski, Lara Baccarin
ATIVIDADE in vitro ANTI-Pythium insidiosum DO
CLORIDRATO DE AMOROLFINA E AZITROMICINA ISOLADAMENTE E
EM COMBINAÇÃO / Lara Baccarin Ianiski.- 2020.
63 f.; 30 cm

Orientadora: Sônia de Avila Botton
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. P. insidiosum 2. Teste de Suscetibilidade 3.
Amorolfina 4. Azitromicina I. de Avila Botton, Sônia II.
Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da usm. dados fornecidos pelo autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. biblioteca responsável paula schoenfeldt satta ctm 10/1728.

Declaro, LARA BACCARIN IANISKI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Lara Baccarin Ianiski

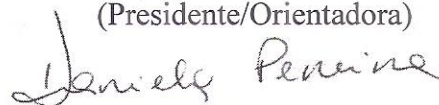
ATIVIDADE *in vitro* ANTI-*Pythium insidiosum* DO CLORIDRATO DE AMOROLFINA E AZITROMICINA ISOLADAMENTE E EM COMBINAÇÃO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 28 de agosto de 2020:



Sônia de Avila Botton, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Daniela Isabel Brayer Pereira, Dra. (UFPEL)



Carla Weiblen, Dra. (URI Santiago)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Lídio e Ivete, por todo incentivo, carinho e amor.
Vocês são meus exemplos de luta e minha fonte de determinação!

EU AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por todas as bênçãos e por dar sentido a minha vida.
- Aos meus pais Lídio Zemf Ianiski e Ivete Libera Baccarin Ianiski, pela dedicação, amor, confiança e apoio em todas as horas, me incentivando a buscar sempre o conhecimento e lutar pelos meus sonhos.
- As minhas irmãs Marina Baccarin Ianiski e Valéria Baccarin Ianiski, pelo estímulo a seguir meus objetivos, pelo carinho e amizade.
- Aos meus avós Jotir Baccarin, Severina Luíza Baccarin e Maria Zemf Ianiski, pelo amor, carinho, orações e por compreenderem minhas ausências!
- Ao meu companheiro de vida Gustavo Brocardo Guimarães, pelo companheirismo, paciência e amor.
- A minha orientadora, professora Sônia de Avila Botton, por quem tenho admiração, agradeço pela oportunidade a mim conferida desde a graduação para fazer parte deste Laboratório. Pelos ensinamentos, conselhos, amizade e carinho.
- Ao meu coorientador, professor Janio Morais Santurio, pela disponibilidade em coorientar este trabalho, pelos ensinamentos e contribuições, sempre disposto a ajudar.
- À professora Daniela Isabel Brayer Pereira e Laura Bedin Denardi, pela disponibilidade em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.
- À Paula Cristina Stibbe, por ser minha companheira desde a iniciação científica, por sempre estar pronta a ajudar. Obrigada pelas conversas, angústias compartilhadas e pela amizade.
- À Carla Weiblen, por me inspirar e estimular a seguir a área da pesquisa, você foi muito importante nessa minha caminhada, obrigada pelo aprendizado, por sempre estar disposta a ajudar e pela amizade.
- A todo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) pela convivência diária, troca de experiências, rodas de chimarrão, café e pela ajuda que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
- Aos demais familiares e amigos que sempre estiveram me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro à pesquisa.
- À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo ensino de excelência e oportunidades oferecidas.

RESUMO

ATIVIDADE *in vitro* ANTI-*Pythium insidiosum* DO CLORIDRATO DE AMOROLFINA E AZITROMICINA ISOLADAMENTE E EM COMBINAÇÃO

AUTORA: Lara Baccarin Ianiski
ORIENTADORA: Sônia de Avila Botton

Pythium insidiosum, pertence ao Reino Stramenopila (super grupo *Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria* - SAR), Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *Pythium insidiosum* é o agente etiológico da pitiose, doença granulomatosa crônica, geralmente fatal, com capacidade de infectar animais e seres humanos. Prevalente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, a pitiose é comumente relatada em seres humanos no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia. Entretanto, no Brasil, a pitiose tem maior ocorrência no Pantanal Mato-Grossense e no Rio Grande do Sul, sendo a espécie equina a mais acometida. Este oomiceto apresenta características que o distingue dos fungos, especialmente a via de biossíntese de ergosterol incompleta, principal alvo de ação de fármacos antifúngicos existentes, tornando-o pouco suscetível as terapias quimioterápicas comercialmente disponíveis. Na tentativa de estabelecer um protocolo terapêutico eficiente para o controle desta enfermidade, possibilidades terapêuticas visando combater infecções por *P. insidiosum* vêm sendo amplamente avaliadas. Sendo assim, este estudo, avaliou o perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* (n = 20) frente ao cloridrato de amorolfina (AMR) e à azitromicina (AZM) isoladamente e em combinação. Os testes de suscetibilidade foram realizados de acordo com protocolo M38-A2 do CLSI e as combinações foram avaliadas pelo método de microdiluição *checkerboard*. Adicionalmente, realizou-se microscopia eletrônica de varredura e transmitância a fim de verificar os efeitos sobre os isolados tratados com os fármacos. Todos os isolados de *P. insidiosum* avaliados apresentaram concentração inibitória mínima (CIMs) variando de 16 a 64 mg/L quando utilizado AMR e de 8 a 64 mg/L para AZM. Interações sinérgicas não foram observadas, evidenciando-se 59,8% de antagonismo e 36,2% de interações indiferentes. Nas análises de microscopia eletrônica de varredura e transmitância, evidenciou-se alterações na superfície das hifas de *P. insidiosum*, desorganização das organelas intracelulares, bem como modificações na membrana plasmática e na parede celular quando o micro-organismo foi tratado com ambos os fármacos. O uso dos fármacos isoladamente apresentou um potencial terapêutico significativo para o tratamento da pitiose. Este é o primeiro estudo a demonstrar a atividade *in vitro* da AMR, bem como avaliar sua combinação com AZM frente a *P. insidiosum*. Desta forma, este fármaco pode representar um potencial terapêutico a ser futuramente pesquisado contra formas cutâneas e subcutâneas de pitiose.

Palavras-chave: Oomiceto. Pitiose. Suscetibilidade. Amorolfina. Azitromicina. Tratamento

ABSTRACT

***In vitro* ANTI-*Pythium insidiosum* ACTIVITY OF AMOROLFINE HYDROCHLORIDE AND AZITHROMYCIN, ALONE AND IN COMBINATION**

AUTHOR: Lara Baccarin Ianiski

ADVISOR: Sônia de Avila Botton

Pythium insidiosum, belonging to the Kingdom Stramenopila (super group *Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria* - SAR), Class Oomycetes, Order Pythiales, Family Pythiaceae, Genus *Pythium* and Species *Pythium insidiosum* is the etiological agent of pythiosis, a chronic granulomatous disease, usually fatal, capable of infecting animals and humans. It is occurring in tropical, subtropical, and temperate areas. Pythiosis is commonly reported in humans in Southeast Asia, mainly in Thailand. Conversely, in Brazil, pythiosis affects mostly equines and it is more prevalent in Pantanal Mato-Grossense and Rio Grande do Sul. This oomycete has characteristics that distinguish it from fungi, especially the incomplete ergosterol biosynthesis pathway, the main target of action of existing antifungal drugs, making it less susceptible to commercially available chemotherapeutic therapies. In an attempt to establish an efficient therapeutic protocol for the control of this disease, therapeutic possibilities to combat infections by *P. insidiosum* have been widely evaluated. Thus, this study evaluated the *in vitro* susceptibility profile of *P. insidiosum* isolates (n = 20) against amorolfine hydrochloride (AMR) and azithromycin (AZM) alone and in combination. The susceptibility tests were performed according to CLSI protocol M38-A2 and the combinations were evaluated by the checkerboard microdilution method. In addition, scanning electron microscopy and transmittance were performed in order to verify the effects on the isolates treated with the drugs. All *P. insidiosum* isolates evaluated showed minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 16 to 64 mg/L when using AMR and from 8 to 64 mg/L for AZM. Synergistic interactions were not observed, showing 59.8% antagonism and 36.2% indifferent interactions. The scanning electron microscopy and transmittance analyzes showed changes in the surface of the hyphae of *P. insidiosum*, disorganization of the intracellular organelles, as well as changes in the plasma membrane and cell wall when the microorganism was treated with both drugs. The use of drugs alone presented significant therapeutic potential for the treatment of pythiosis. This is the first study to demonstrate the *in vitro* activity of AMR, as well as to evaluate its combination with AZM against *P. insidiosum*. Thus, this drug may represent a therapeutic potential to be further investigated against cutaneous and subcutaneous forms of pythiosis.

Keywords: Oomycete. Pythiosis. Susceptibility. Amorolfine. Azithromycin. Treatment.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figura 1 – (Figure 1) *Pythium insidiosum* ultrastructure (CBS 575.85) visualized in Transmission Electron Microscopy. (A) *Pythium insidiosum* hyphae (control). Lipid (L). Mitochondria (M). Vacuole (V). Cell wall (W). Plasma membrane (PM). (B) Azithromycin-treated *Pythium insidiosum* hyphae, with plasma membrane leaflets spaced apart due to the accumulation of homogeneous-looking material (between arrows). There is a point where the space between the membranes is apparently preserved (arrowhead). Presence of areas with ribosome accumulations (white arrow). Absence of mitochondria in the hyphal cytoplasm. Vacuoles (V). (C) *Pythium insidiosum* hyphae (control). Lipid (L). Mitochondria (M). Vacuole (V). Cell wall (W). Plasma membrane (PM). Smooth endoplasmic reticulum (arrow). (D) *Pythium insidiosum* hyphae treated with amorolfine hydrochloride, presenting accumulation of finely granular material occupying extensive area of cytoplasm. Note the absence of intracytoplasmic vacuoles. Dilated smooth endoplasmic reticulum (arrow) At the ends of the hyphae the plasma membrane is not clearly observed and the cell wall is apparently thickened. Mitochondria (M). Core (N). Smooth endoplasmic reticulum (arrowhead).....46

Figura 2 – (Figure 1) *Pythium insidiosum* ultrastructure (CBS 575.85) visualized in Scanning Electron Microscopy. (A) Turgid-looking *Pythium insidiosum* hyphae with integral surface. (B) *Pythium insidiosum* hyphae treated with amorolfine hydrochloride, with a roughened surface, with a retracted and brittle appearance.....47

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – (Table 1) <i>In vitro</i> activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin against <i>Pythium insidiosum</i> isolates ($n=20$).....	44
Tabela 2 – (Table 2) <i>In vitro</i> combination of amorolfine hydrochloride and azithromycin against <i>Pythium insidiosum</i> isolates ($n=20$).....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	AGENTE ETIOLÓGICO	17
3.1.1	Pitiose	18
3.1.2	Diagnóstico	21
3.1.3	Alternativas de tratamento	22
3.2	FARMÁCOS ANTIMICROBIANOS.....	24
3.2.1	Cloridrato de amorolfina	24
3.3.2	Azitromicina.....	25
4	ARTIGO	27
5	CONCLUSÕES.....	48
6	REFERÊNCIAS.....	49
7	ANEXO.....	61

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está composta por um manuscrito científico o qual se encontra na seção **ARTIGO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

O item **REFERÊNCIAS** refere-se às citações contidas nas seções **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

Os oomicetos pertencentes ao gênero *Pythium*, os quais compreendem mais de 140 espécies, que em sua grande maioria são sapróbios e patógenos de plantas, algas, peixes, insetos e mamíferos (KAGEYAMA, 2014). A pitiose, causada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum*, é uma enfermidade granulomatosa crônica, geralmente fatal, sendo descrita principalmente em equinos, caninos e seres humanos (GAASTRA et al., 2010; CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2013a; PERMPALUNG et al., 2019). Esta enfermidade possui distribuição mundial, sendo relatada em regiões alagadiças de clima tropical, subtropical e temperado (SANTURIO et al., 1998; GAASTRA et al., 2010). No Brasil, o Pantanal Mato-Grossense e Rio Grande do Sul são os locais endêmicos para a pitiose equina (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2014; WEIBLEN et al., 2016). Entretanto, a Tailândia apresenta a maior ocorrência para pitiose humana (LEAL et al., 2001a; KRAJAEJUN et al., 2006; PERMPALUNG et al., 2019).

P. insidiosum apresenta características morfofisiológicas similares aos micro-organismos pertencentes ao Reino Fungi. Além disso, o aspecto clínico das lesões ocasionadas pelo oomiceto nos indivíduos acometidos pode ter apresentações clínicas semelhantes a outras enfermidades, especialmente as tumorais e parasitárias. Sendo assim é imprescindível a realização de diagnóstico laboratorial diferencial o mais rápido possível, pois quanto mais cedo for diagnosticada a presença de *P. insidiosum*, maiores são as chances de cura do paciente (GAASTRA et al., 2010). As técnicas diagnósticas necessitam de laboratórios especializados e incluem o isolamento e a identificação do agente por métodos morfofisiológicos, sorológicos e moleculares (LEAL et al., 2001a; SCHURKO et al., 2004; SANTURIO et al., 2006a; BOTTON et al., 2011; THONGSRI et al., 2013; INKOMLUE et al., 2016; INTARAMAT et al., 2016; WEIBLEN et al., 2019).

As opções terapêuticas para a pitiose baseiam-se em cirurgia, quimioterapia e imunoterapia, normalmente associando duas opções de tratamento na tentativa de obterem-se melhores resultados terapêuticos (GAASTRA et al., 2010). O sucesso das diferentes formas de tratamento é muito variável e, na maioria das vezes, influenciado pelo tamanho e tempo de desenvolvimento da lesão, idade e estado nutricional do animal (SANTURIO et al., 2006b).

P. insidiosum apresenta via de biossíntese de ergosterol incompleta, local de ação da maioria das drogas antifúngicas; deste modo, o tratamento de infecções causadas pelo agente em animais e humanos torna-se bastante complicado. Todavia, o uso de antifúngicos no tratamento da pitiose tem sido relatado, porém, com resultados controversos (SHENEP et

al., 1998; MENDOZA et al., 2004; KRAJAEJUN et al., 2006b, SANTURIO et al., 2006b; PEREIRA et al., 2013; CARVALHO et al., 2019).

Estudos avaliando o perfil de suscetibilidade *in vitro* evidenciaram que *P. insidiosum* apresenta suscetibilidade aos diversos agentes antimicrobianos empregados no controle de alguns fungos e bactérias. Neste sentido, pesquisas foram publicadas com resultados promissores, utilizando os seguintes fármacos: caspofungina (PEREIRA et al., 2007), voriconazol, itraconazol e terbinafina (ARGENTA et al., 2008), azitromicina, terbinafina, benzalcônio, ceftriaxona, cetilpiridínio, mupirocina e triclosan (ITAQUI et al., 2016). Adicionalmente há relatos de combinação entre diferentes fármacos, incluindo: terbinafina e itraconazol (SHENEP et al., 1998; PEREIRA et al., 2013; PERMPALUNG et al., 2015), anfotericina B e iodeto de potássio (MENDOZA et al., 2004), azitromicina, minociclina e tigeclina (LORETO et al., 2014), minociclina, azitromicina, claritromicina e tigeclina (JESUS et al., 2015a).

Loreto et al. (2011), realizaram um estudo pioneiro utilizando o fármaco antibacteriano azitromicina frente a *P. insidiosum*, demonstrando que este fármaco possui capacidade de inibir o crescimento micelial do oomiceto. O mecanismo de ação da azitromicina é baseado na inibição da síntese proteica através da sua ligação com a subunidade ribossomal 50S, bloqueando a translocação de peptídeos (PARNHAM et al., 2014). No entanto, o modo de ação de azitromicina anti-*P. insidiosum* não foi esclarecida, sendo sugerido ser semelhante a ação de antibacterianos frente a *Pythium ultimum*, com redução na incorporação de aminoácidos em proteínas, inibição de síntese proteica e inibição do transporte de aminoácidos (RAWN & VAN ETTEN, 1977).

Adicionalmente, até o momento, a utilização de cloridrato de amorolfina para inibir o crescimento de *P. insidiosum* não foi avaliada. Desta forma, estudos mais detalhados utilizando cloridrato de amorolfina se fazem necessários, uma vez que este é um antifúngico de amplo espectro de ação, apresentando atividade fungicida e fungistática, empregado no tratamento de infecções em humanos, animais e plantas (POLAK 1992; TAMURA et al., 2014; SEQUEIRA-OVIEDO et al., 2017). Ademais, pesquisas envolvendo tecnologias, como a microscopia eletrônica, devem ser pesquisadas a fim de auxiliar nas investigações das ações de fármacos e aprimorar a terapêutica da doença (TROLEZI et al., 2017; VALENTE et al., 2019).

Devido aos problemas no tratamento da pitiose, em consequência das características morfofisiológicas singulares de *P. insidiosum*, estudos empregando fármacos antimicrobianos se fazem necessários, pois, novas abordagens terapêuticas podem apresentar resultados

promissores no tratamento da doença e, desta forma, incrementar o arsenal terapêutico anti-*P. insidiosum*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de antifúngico cloridrato de amorolfina e antibacteriano azitromicina frente a isolados de *P. insidiosum*, bem como verificar as alterações morfológicas e danos celulares ocasionados pelos fármacos sobre as hifas do oomiceto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* frente ao antifúngico morfolínico cloridrato de amorolfina;
- Verificar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* frente ao antibacteriano macrolídeo azitromicina;
- Classificar os efeitos da associação de cloridrato de amorolfina e azitromicina, em sinérgico, indiferente ou antagônico, com base no cálculo do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF);
- Verificar as alterações morfológicas e danos celulares ocasionados pelos fármacos cloridrato de amorolfina e azitromicina sobre hifas de *P. insidiosum*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A enfermidade denominada de ferida da moda, dermatite granular, granuloma fomicótico, zigomicoze, hifomicose, “bursattee”, “Florida leeches”, “swamp cancer”, e amplamente conhecida por pitiose, é uma doença infecciosa de importância mundial causada pelo oomiceto *P. insidiosum* (GAASTRA et al., 2010; CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2013a).

De Haan & Hoogkamer (1901) isolaram pela primeira vez *P. insidiosum* de lesões subcutâneas de equinos na Indonésia; entretanto, a classificação do agente etiológico recebeu diversas denominações até o final da década de 80, quando estudos realizados por De Cock et al. (1987) possibilitaram classificar o gênero *Pythium* no Reino Prototista, Ordem Peronosporales e Filo Oomycota. Mendoza et al. (1996) sugeriram a modificação da classificação do gênero *Pythium* devido as pesquisas realizadas sobre a caracterização do Reino Protista, sugerindo que *P. insidiosum* fizesse parte do Reino Chromista, Filo Pseudo-fungi, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae. Todavia, a classificação mais recente inseriu *P. insidiosum* no Reino Stramenopila (super grupo *Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria* - SAR), Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *Pythium insidiosum* (ALEXOPOULOS et al., 1996; DICK et al., 2001; MCCARTHY et al., 2017).

Estudos detalhados de taxonomia e filogenia, revelaram que apesar da semelhança microscópica e macroscópica de *P. insidiosum* com membros do Reino Fungi, os oomicetos estão mais relacionados com as algas e as diatomáceas (KWON-CHUNG, 1994; ADHIKARI et al., 2013). Essa relação distinta taxonomicamente entre fungos e oomicetos é retratada devido às diferenças entre os seus constituintes celulares. Os principais componentes de parede celular fúngica e membrana plasmática são quitina e ergosterol, respectivamente. Todavia, os oomicetos apresentam celulose, β -glucanas e hidroxiprolina como constituintes de parede celular e não apresentam ergosterol como o principal esteroide de membrana, devido este possuir a via de biossíntese incompleta (HENDRIX, 1964; MOORE-LANDECKER, 1996; MENDOZA et al., 2005; SANTURIO et al., 2006b; LERKSUTHIRAT et al., 2017). Além disso, o gênero *Pythium* apresenta características bioquímicas exclusivas, como uma rota alternativa para síntese de lisina (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Espécies de *Pythium* apresentam diferenças genéticas, variações de hospedeiros, virulência e distribuição, habitando ambientes terrestres e aquáticos (JIANG; TYLER, 2012;

ADHIKARI et al., 2013; KAGEYAMA, 2014). Morfologicamente, as espécies caracterizam-se por apresentar reprodução sexuada oogâmica e reprodução assexuada quando desenvolvem zoosporângios e zoósporos biflagelados, os quais permitem sua mobilidade em meio aquático (MENDOZA et al., 2013). No entanto, as condições ambientais de temperatura (30–45 °C), presença de água (pântanos, lagos, rios) e plantas, são essenciais para o desenvolvimento micelial deste micro-organismo (GAASTRA et al., 2010).

Até o momento, mais de 140 espécies do gênero *Pythium* são conhecidas, sendo muitas sapróbios e patógenos de plantas, algas, peixes, insetos e mamíferos (KAGEYAMA, 2014). Por muitos anos, *P. insidiosum* era a única espécie desse gênero considerada agente etiológico de enfermidades em mamíferos (DE COCK et al., 1987; ALEXOPOULOS et al., 1996; GAASTRA et al., 2010). Entretanto, dois relatos de infecções em humanos relacionadas ao fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* foram descritas e, desse modo, destaca-se que outras espécies do gênero *Pythium* podem apresentar potencial patogênico para mamíferos (CALVANO et al. 2011; FARMER et al. 2015).

3.1.1 Pitiose

Descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, a pitiose é uma doença granulomatosa crônica, com capacidade de infectar animais e seres humanos, não sendo relatada transmissão direta entre os animais e dos animais para humanos (SANTURIO et al., 1998; MENDOZA et al., 2005; GAASTRA et al., 2010).

A transmissão de *P. insidiosum*, ocorre através do contato com a sua forma infectante, os zoósporos biflagelados móveis. Em condições ambientais de desenvolvimento descritas, os zoósporos se movimentam na água, assim que encontram outro hospedeiro (animais ou plantas), encistam formando um tubo germinativo, o qual irá originar um novo micélio, estabelecendo uma nova colonização (MILLER, 1983; SANTURIO et al., 2006b; GAASTRA et al., 2010).

As hifas de *P. insidiosum* não apresentam capacidade de penetrar a pele íntegra; diante de estudos, pesquisadores sugerem que os zoósporos penetram na pele através da sua adesão aos folículos pilosos do hospedeiro e, possivelmente, a infecção ocorra através de lesão preexistente (MENDOZA et al., 1993; SANTURIO et al., 1998; RAVISHANKAR et al., 2001; PERMPALUNG et al., 2019). Outra suspeita é de que alguns mamíferos possam ser portadores de defeitos genéticos, especialmente relacionados à resposta imune, predispondo-os à infecção (MENDOZA et al., 2005).

Diferentes espécies de mamíferos são acometidas pela doença, contudo, a maioria dos relatos de pitiose são descritos na espécie humana, equina e canina (GROOTERS, 2003; GAASTRA et al., 2010; CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2013a; PERMPALUNG et al., 2019). Relatos também foram registrados em bovinos (MILLER et al., 1985; SANTURIO et al., 1998; GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009), ovinos (SANTURIO et al., 2008; CARRERA et al., 2013; PESSOA et al., 2013), asininos (CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2013b; MAIA et al., 2016), caprinos (CARMO et al., 2014), felinos (BISSONNETTE et al., 1991; RAKICH et al., 2005; GALIZA et al., 2014; FORTIN et al., 2017; SOARES et al., 2019), aves (PESAVENTO et al., 2008; SOUTO et al., 2019) e animais selvagens (GAASTRA et al., 2010; VIDELA et al., 2011).

A pitiose geralmente manifesta-se em animais na forma de lesões cutâneas, subcutâneas e viscerais (MENDOZA et al., 2005; SANTURIO et al., 2006b; GAASTRA et al., 2010; CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2013a), enquanto que em humanos apresenta as formas cutâneas, subcutâneas, ocular e sistêmicas (THIANPRASIT et al., 1996; PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; KRAJAEJUN et al., 2006; PERMPALUNG et al. 2015; PERMPALUNG et al., 2019).

Casos de pitiose humana, na sua grande maioria, são observados em pessoas que desenvolvem atividades agrícolas ou de lazer em regiões alagadiças, devido ao fato de estarem mais expostos à forma infectante. A Tailândia é o país de maior incidência de pitiose humana, sendo principalmente pacientes portadores de β -talassemia ou de distúrbios hematológicos (KRAJAEJUN et al., 2006; SUDJARITRUK; SIRISANTHANA, 2011; KEOPRASOM et al., 2013; PERMPALUNG et al., 2015; PERMPALUNG et al., 2019).

Bosco et al. (2005), relataram um caso de pitiose humana no Brasil. Um paciente do sexo masculino, apresentou lesões cutâneas após entrar em contato com águas paradas e a confirmação do diagnóstico para a presença de *P. insidiosum* foi realizado através de análise molecular (MARQUES et al., 2006). Além disso, países como Canadá, Estados Unidos, Austrália, França, Israel e China também registraram casos de pitiose humana (PERMPALUNG et al., 2019).

Entre os animais, a espécie equina é a mais acometida pela doença, apresentando lesões ulcerativas granulomatosas extensas e de rápida evolução, semelhantes a tumor, com hifas, eosinófilos e células necróticas, formando massas branco-amareladas de aspecto arenoso e ramificadas, denominadas “kunkers” (LEAL et al., 2001b; POOLE & BRASHIER, 2003; GAASTRA et al., 2010; CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2013a). Frequentemente, as lesões se formam nas extremidades distais dos membros, porção ventral, face e regiões

anatômicas de maior contato com águas contaminadas por zoósporos (KWONCHUNG, 1994; SANTURIO et al., 2006b; SANTOS et al., 2014). A forma gastrointestinal é relatada em equinos e caracteriza-se pela presença de massas tumorais localizadas na parede do intestino ocasionando a diminuição e obstrução do lúmen intestinal (REIS et al., 2003; BEZERRA JÚNIOR et al., 2010; CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2013a). Ademais, Rossato et al. (2018) descreveram um caso de pitiose equina, acometendo o palato mole do animal, ocasionando disfagia e dificuldade respiratória, não apresentando sinais clínicos como os que são geralmente observados nos casos de pitiose, incluindo lesões cutâneas ulceradas, pruriginosas e sero-hemorrágicas.

No Brasil, a pitiose equina é considerada uma enfermidade emergente descrita pela primeira vez na Região Sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul (RS) por Santos e Londero (1974). Apesar de ser relatada em outros estados brasileiros como Mato Grosso do Sul, São Paulo, Pará, Paraíba, Paraná e Rio de Janeiro (SALLIS et al., 2003; HEADLEY et al., 2004; VIANA et al., 2020), sua maior ocorrência é na região do Pantanal Mato-grossense (SANTURIO et al., 1998; LEAL et al., 2001a; SANTOS et al., 2014) e RS (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014; WEIBLEN et al., 2016; REIS-GOMES et al., 2018). Entretanto, casos de pitiose equina têm sido relatados em outros países, como por exemplo: Costa Rica (MENDOZA et al., 1986), Colômbia (CARDONA-ALVAREZ et al., 2010), Venezuela (LUIS- LÉON et al., 2011), Uruguai (ROMERO et al., 2019), Egito (TARTOR et al., 2020) e Tailândia (TONPITAK et al., 2018; HTUN et al., 2020).

A espécie canina representa a segunda espécie animal relatada como a mais acometida por *P. insidiosum* (DYKSTRA et al., 1999), sendo as formas cutâneas e gastrintestinais as mais comuns (PEREIRA et al., 2013). A principal fonte de infecção é pela ingestão de água contaminada com a forma infectante. Os cães acometidos geralmente apresentam manifestações clínicas denotadas por vômitos, diarreia e perda de peso. Estes sinais são em decorrência da formação de uma grande quantidade de massa e presença de hifas no estômago e intestino, caracterizando a forma gastrointestinal da doença (SANTURIO et al., 2006b; BERRYESSA et al., 2008; TROST et al., 2009; MARTINS et al., 2012; FRADE et al., 2017). Contudo, outras formas clínicas podem ocorrer. No Brasil, o primeiro caso de pitiose canina foi reportado em uma fêmea apresentando lesão cutânea no membro posterior direito (LARSSON et al., 1997).

3.1.2 Diagnóstico

Devido a sua semelhança estrutural com micro-organismos fúngicos, bem como o aspecto das lesões nos indivíduos acometidos por *P. insidiosum* podem ser confundidos com outras enfermidades, incluindo habronemose, zigomicose, conidiobolomicose, basidiobolomicose, neoplasia, tecido de granulação exuberante e demais granulomas de origem fúngica e bacteriana (CHAFFIN et al., 1992; KAUFMAN, 1998; LEAL et al., 2001b; SANTURIO et al., 2008); a realização de diagnóstico laboratorial é imprescindível. Salienta-se que quanto mais cedo for realizada a identificação do agente e a instauração do tratamento, aumentam-se as chances de cura do paciente (GAASTRA et al., 2010).

Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose é realizado através dos sinais clínicos, exames histopatológicos e visualização dos aspectos culturais e morfológicos a partir do isolamento do micro-organismo em meios de cultura (LEAL et al., 2001b; SANTURIO et al., 2008; GAASTRA et al., 2010). Além disso, técnicas sorológicas para detecção de anticorpos, como por exemplo: imunodifusão (KAUFMAN et al., 1990; PRACHARKTAM et al., 1991; MENDOZA et al., 1996), imunohistoquímica (BROWN et al., 2008; INKOMLUE et al., 2016), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (MENDOZA et al., 1997; KRAJAEJUN et al., 2002), testes imunocromatográficos (KRAJAEJUN et al., 2009; INTARAMAT et al., 2016) e testes de hemaglutinação (JINDAYOK et al., 2009), bem como o uso de técnicas moleculares (SCHURKO et al., 2004; BOTTON et al., 2011; THONGSRI et al., 2013; RUJIRAWAT et al., 2017; WEIBLEN et al., 2019; TARTOR et al., 2020), estão sendo empregadas para uma correta identificação do agente etiológico e conseqüentemente, fornecem um melhor prognóstico da doença.

P. insidiosum é cultivado em meio ágar com poucos nutrientes, tais como ágar *Sabouraud* e *Corn Meal Agar* (CMA), num período de 24 à 48h em temperatura de incubação de 37 °C. Suas colônias apresentam-se na forma plana e microscopicamente é possível visualizar a formação de hifas cilíndricas, largas e hialinas, esparsamente septadas, sendo raramente observado produção de estruturas reprodutivas. (MENDOZA et al., 1996; GROOTERS et al., 2002; GAASTRA et al., 2010).

Devido à dificuldade de se observar a produção de estruturas reprodutivas, a utilização de técnicas para induzir a formação de zoósporos se torna necessária, pois estas estruturas são amplamente utilizadas em testes de suscetibilidade *in vitro* (PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2008; CAVALHEIRO et al., 2009a; MAHL et al., 2012; JESUS et al., 2015a; JESUS et al., 2015b) e em ensaios *in vivo*, para a reprodução da doença em modelo

experimental (coelhos) (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2007; JESUS et al., 2015b; ZAMBRANO et al., 2017; ZIMMERMANN et al., 2020).

3.1.3 Alternativas de tratamentos à pitiose

Habitualmente, o tratamento da pitiose consiste em remoção cirúrgica, quimioterapia e imunoterapia, de modo que, o seu sucesso está diretamente relacionado ao tamanho da lesão, localização e tempo de evolução, além de aspectos imunológicos do hospedeiro acometido e o grau de invasão do processo infeccioso (HEADLEY et al., 2004; GAASTRA et al., 2010).

Diante das dificuldades encontradas no tratamento da pitiose, a imunoterapia surgiu como uma alternativa promissora. Desenvolvida por Miller (1981), a partir de hifas sonicadas do próprio agente etiológico, e posteriormente adaptada por Mendoza et al. (2003) e Santurio et al. (2003), permitiu ser amplamente utilizada no tratamento da pitiose em equinos, principalmente no Brasil (SANTURIO et al., 2006b; SANTOS et al., 2011a; SANTOS et al., 2011b). Fundamentado na alteração da resposta celular, seu mecanismo de ação baseia-se na exposição dos antígenos de *P. insidiosum* de forma distinta às células apresentadoras de antígenos, induzindo a diferenciação de células Th0 em células Th1 que liberam interferon- γ (INF- γ) e interleucina 2 (IL-2), aumentando a resposta mediada por células, e ativando células T citotóxicas capazes de debelar a infecção (SANTURIO et al., 2003; MENDOZA et al., 2005). A associação da imunoterapia a outros métodos de tratamento tem apresentado melhores resultados no tratamento da pitiose equina (MILLER et al., 1981; SANTURIO et al., 2003; ZARO et al., 2018), canina (HENSEL et al., 2003; PEREIRA et al., 2013) e em humanos (THYTHANYANOT et al., 1998; WANACHIWANAWIN et al., 2004; THANATHANEE et al., 2013).

Outro método de tratamento de pitiose é a intervenção cirúrgica, o qual apresenta resultados satisfatórios, sendo considerado uma das opções de tratamento mais eficazes. Contudo, seu uso é limitado, devendo ser utilizado apenas em casos específicos, como lesões pequenas e superficiais, em que seja possível a remoção de toda área comprometida com ampla margem de segurança, evitando recidivas e proporcionando melhor cicatrização (SANTURIO et al., 2006b). Em animais, as associações de tratamento cirúrgico com drogas antifúngicas ou iodeto de potássio em casos de cura terapêutica são descritas na literatura (PEREIRA et al., 2013; CARVALHO et al., 2019).

Teoricamente, devido ao agente etiológico apresentar características morfofisiológicas singulares diversas dos fungos, seria esperado que os casos de pitiose não respondessem

adequadamente as terapias com fármacos antifúngicos. No entanto, resultados contraditórios têm sido relatados (HUBERT, GROOTERS, 2002; MENDOZA et al., 2004; KRAJAEJUN et al., 2006). Estudos avaliando a suscetibilidade *in vitro* evidenciaram que *P. insidiosum* apresenta suscetibilidade a diversos agentes antifúngicos como fluconazol, cetoconazol e miconazol (SHENEP et al., 1998), caspofungina (PEREIRA et al., 2007), voriconazol, itraconazol (ARGENTA et al., 2008) e terbinafina (ARGENTA et al., 2008; ITAQUI et al., 2016). Adicionalmente, existem os relatos de suscetibilidade quando avaliadas combinações farmacológicas de terbinafina e itraconazol (SHENEP et al., 1998; PEREIRA et al., 2013; PERMPALUNG et al., 2015), anfotericina B e iodeto de potássio (MENDOZA et al., 2004), terbinafina e antifúngicos azólicos e caspofungina (CAVALHEIRO et al., 2009a), anfotericina B e terbinafina (CAVALHEIRO et al., 2009b) e terbinafina e cetrimida (ITAQUI et al., 2016).

Nos últimos anos, a avaliação da atividade anti-*P. insidiosum* de diferentes substâncias de origem natural e sintética vêm sendo verificada em estudos *in vitro* e *in vivo* (LORETO et al., 2012; FONSECA et al., 2015; JESUS et al., 2015b; ARAÚJO et al., 2016; VALENTE et al., 2016; SUTHIWONG et al., 2017; VALENTE et al., 2019). Neste contexto, notoriamente, uma ampla gama de fármacos antibacterianos vem sendo pesquisada (LORETO et al., 2011; MAHL et al., 2012; JESUS et al., 2015a; ITAQUI et al., 2016; LORETO et al., 2018a).

Loreto et al. (2014) estudaram a suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum*, empregando técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo, propostas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e E-Test, frente aos antifúngicos anfotericina e azólicos, e antibacterianos azitromicina, tetraciclina, minociclina, doxiciclina, eritromicina, cloranfenicol, claritromicina, clindamicina, florfenicol, linezolida, ácido fusídico, mupirocin e roxitromicina. Adicionalmente, Jesus et al., (2014) relatam a atividade *in vitro* de azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina isoladamente e em combinação com anfotericina B, itraconazol, terbinafina, voriconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina, demonstrando principais efeitos sinérgicos nas combinações de minociclina com anfotericina B, itraconazol e micafungina e de claritromicina com micafungina.

A ação *in vitro* contra *P. insidiosum* dos antibióticos azitromicina, claritromicina, minociclina e tigeciclina em testes isolados e em combinação dos fármacos foi avaliada por Jesus et al., (2015b), resultando em > 60% de interações sinérgicas, por conseguinte, estudo *in vivo* em modelo experimental de coelho demonstraram que azitromicina isoladamente ou em combinação com minociclina foram eficazes no tratamento de pitiose subcutânea do modelo

experimental, reduzindo significativamente a carga microbiana. Corroborando com os resultados de Loreto et al. (2014) e Jesus et al. (2014; 2015b), Worasilchai et al. (2020) descreveram sucesso nos testes de suscetibilidade *in vitro* contra isolados tailandeses de *P. insidiosum* utilizando os antibióticos doxiciclina, minociclina, tigeciclina, azitromicina e claritromicina.

Uma vez que, não existem protocolos 100% estabelecidos para tratamento de pitiose, Cardona-Álvarez et al. (2016), descreveram pela primeira vez o uso de triancinolona acetona intramuscular, um corticosteroide utilizado para tratamento de doenças respiratórias e oculares, no tratamento de pitiose cutânea em equinos. Os resultados demonstraram 100% (24/24 equinos) de cura, em um período médio de 60 dias após o tratamento. Acredita-se que os corticoides possuam atividade imunomoduladora através da inibição da síntese, liberação e ação de citocinas e outros componentes moduladores da resposta inflamatória e imunológica, atuando diretamente na diminuição de eosinófilos na região afetada. Dessa forma, com a redução de eosinófilos na área da lesão, há a possibilidade de tornar o micro-organismo suscetível à resposta imunológica do hospedeiro e, possivelmente, ocasionar a regressão da lesão (CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2016).

Contudo, embora existam diversos estudos que evidenciam a atividade de fármacos antimicrobianos frente ao oomiceto *P. insidiosum*, o êxito da monoterapia dificilmente é atingida, sendo necessário realizar a combinação das diferentes terapias disponíveis (PEREIRA et al., 2007; KRAJAEJUN et al., 2006; THANATHANEE et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; CARVALHO et al., 2019).

Interessantemente apesar dos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstrarem a atividade anti-*P. insidiosum* de diferentes classes farmacológicas, os estudos avaliando as alterações e os danos celulares ocasionados ao micro-organismo são incipientes. Todavia, a realização de pesquisas envolvendo tecnologias, como por exemplo, a microscopia eletrônica, devem ser exploradas a fim de contribuir nas investigações das ações farmacológicas e aprimorar conhecimentos à terapêutica desta doença (TROLEZI et al., 2017; VALENTE et al., 2019).

3.2 FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

3.2.1 Cloridrato de amorolfina

Único representante da classe dos agentes morfolínicos, o cloridrato de amorolfina é um fármaco antifúngico de amplo espectro, apresentando ação contra fungos patogênicos

responsáveis por infecções em seres humanos, animais e plantas. Seu mecanismo de ação baseia-se na alteração da permeabilidade da membrana celular fúngica devido ao acúmulo de esqualeno, dentre outros metabólitos, pela inibição das enzimas delta-14-redutase e delta-7,8-isomerase, envolvidas na biossíntese do ergosterol (POLAK, 1992; HARIA & BRYSON, 1995).

A amorolfina dispõe de ação fungicida e fungistática, apresentando maior atividade contra fungos leveduriformes, filamentosos e dimórficos, sendo relatado o sucesso da terapia em estudos de suscetibilidade *in vitro* e *in vivo*, contra dermatomicoses e candidíases (POLAK, 1992; POLAK, 1995; FENG et al., 2017). Sua ação fungicida depende da concentração e tempo de exposição ao fármaco, entretanto, é capaz de reduzir recidivas, uma vez que, possui capacidade de atuar sobre estruturas de resistência fúngica. Por outro lado, possui desvantagens quanto à sua aplicação, sendo sua eficácia terapêutica limitada ao uso tópico (NISHIYAMA et al., 1992; MULLER et al., 1992; HARIA & BRYSON, 1995; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2010; FENG et al., 2017).

3.2.2 Azitromicina

Pertencente à classe dos macrolídeos, subclasse azalídeos e derivado sintético da eritromicina, a azitromicina é um antibiótico de amplo espectro de ação, utilizado no tratamento de infecções de pele, tecidos moles, trato respiratório e infecções sexualmente transmissíveis (ZUCKERMAN, 2004; DINOS, 2017).

Este fármaco antibiótico dispõe de aplicação terapêutica oral, oftálmica e intravenosa, sendo rapidamente absorvido após sua administração, acumulando-se com maior eficácia nos fagócitos e com alta capacidade de penetrar e se distribuir pelos tecidos (ZUCKERMAN, 2004; PARNHAM et al., 2014; KAGKELARIS et al., 2018). Além da ação terapêutica contra bactérias (DINOS, 2017) existem relatos de ação contra fungos (NGUYEN et al., 1997; SHI et al., 2010), protozoários (PRATA et al., 2003; AMER et al., 2014), vírus (GIELEN et al., 2010; BOSSEBOEUF et al., 2018) e oomicetos (LORETO et al., 2011; LORETO et al., 2014; JESUS et al., 2015a; ITAQUI et al., 2016; LORETO et al., 2018a; LORETO et al., 2018b).

A azitromicina detém de um mecanismo de ação antibacteriano, baseado na inibição da síntese proteica através da sua ligação com a subunidade ribossomal 50S, bloqueando a translocação de peptídeos (PARNHAM et al., 2014). Além disso, quando administrada concomitantemente com fármacos metabolizados pelos citocromos do P450, não causa

interações, uma vez que, esta é metabolizada lentamente e produz metabólitos inativos (KAGKELARIS et al., 2018).

Estudos realizados por Rawn e Van Etten (1977), descreveram que a reduzida incorporação de aminoácidos em proteínas, a inibição da síntese proteica, bem como a inibição do transporte de aminoácidos, caracteriza o mecanismo de ação antibacteriano de tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina frente ao oomiceto *Pythium ultimum*. Desta forma, acredita-se que a azitromicina seja capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* por um mecanismo de ação similar.

4 ARTIGO – *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination

(Artigo publicado no periódico *Medical Mycology*, myaa032, <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa032>; 2020)

Short title: Antimicrobial effect anti-*P. insidiosum*

Authors: Lara Baccarin Ianiski^{1, 2}, Paula Cristina Stibbe^{1, 2}, Laura Bedin Denardi², Carla Weiblen^{2, 3}, Mauro Pereira Soares^{4, b}, Julia de Souza Silveira Valente^{4, a}, Luís Antônio Sangioni³, Daniela Isabel Brayer Pereira^{4, a}, Janio Morais Santurio², Sônia de Avila Botton^{1, 3, *}

Affiliations: ¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, Brazil.

²UFSM, CCS, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Pesquisas Micológicas, Santa Maria, RS, Brazil.

³UFSM, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. ^aPrograma de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. ^bFaculdade de Veterinária. Pelotas, RS, Brazil.

***Corresponding author**

Sônia de Avila Botton

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Av. Roraima nº 1000, Prédio 44, sala 5125, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-9390. E-mail: sabott20@gmail.com

Keywords: Amorolfine, oomycete, pythiosis, susceptibility, morphological alteration

Abstract

Pythium insidiosum infections have been widely studied in an attempt to develop an effective therapeutic protocol for the treatment of human and animal pythiosis. Several antifungal agents are still prescribed against this oomycete, although they present contradictory results. To evaluate the susceptibility profile and to verify the morphological alterations in *P. insidiosum* isolates treated with amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone or in combination. Susceptibility tests for *P. insidiosum* isolates (n = 20) against amorolfine hydrochloride (AMR) and azithromycin (AZM) were performed according to Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) protocol M38-A2. Combinations of both drugs were evaluated using the checkerboard microdilution method. Additionally, transmission and scanning electron microscopy were performed in order to verify the morphological alterations in *P. insidiosum* isolates in response to these drugs. All *P. insidiosum* isolates had a minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 16 to 64 mg/L and 8 to 64 mg/L for amorolfine hydrochloride and azithromycin, respectively. Synergistic interactions between the drugs were not observed, with antagonism in 59.8 % of isolates, and indifferent interactions in 36.2 %. Electron microscopy showed changes in the surface of *P. insidiosum* hyphae, disorganization of intracellular organelles, and changes in the plasma membrane and cell wall of oomycetes treated with the drugs. This is the first study to demonstrate *in vitro* anti-*P. insidiosum* effect of amorolfine hydrochloride. These results indicate the therapeutic potential of this drug against cutaneous and subcutaneous forms of pythiosis, but further studies are necessary to confirm this potential.

Introduction

The oomycete *Pythium insidiosum*, belonging to kingdom Stramenopila (super group Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria — SAR), class Oomycetes, order Pythiales, family Pythiaceae, genus *Pythium* and species *insidiosum*.^{1, 2} This microorganism causes pythiosis in mammals, mainly horses, canines, and humans. Pythiosis occurs frequently in the wetlands of tropical, subtropical, and temperate areas. The highest occurrence of equine pythiosis can be found in Brazil^{3, 4}, while Thailand represents the highest rate of human pythiosis.⁵

Pythium insidiosum has morphological characteristics similar to true fungi, but this microorganism is classified as an oomycete. One of the main differences between these two types of microorganisms is in the ergosterol biosynthesis pathway, which is the target of most antifungal drugs. This synthesis is incomplete in oomycetes.^{1, 6} At present, there is no effective treatment for pythiosis and current therapy is based on a number of different protocols, including surgery, immunotherapy, and the use of compounds with antimicrobial activity.^{1, 7-12} Thus, the search for a more effective treatment against pythiosis has challenged researchers to examine drugs of different pharmacological classes. *In vitro* and *in vivo* studies have been conducted using drugs such as antifungals^{7, 10, 13-15}, antibacterials^{9, 16-23}, antiparasitics^{21, 22}, corticosteroids¹¹, substances of natural origin^{15, 19, 24}, silver nanoparticles²⁵, selenium organocomposite⁸, and drugs used in treatment of alcoholism.²⁶

However, among the arsenal of antifungal drugs previously evaluated against this oomycete, the class of morpholine antifungal agents has yet to be evaluated. Amorolfine hydrochloride is a broad-spectrum antimycotic with fungicidal and fungistatic activity. It is often employed in the treatment of mycoses in humans, animals and plants.²⁷

Additionally, research evaluating the prospecting of antibacterial drugs has shown that these compounds have relevant anti-*P. insidiosum* activity.^{9, 16-18} The susceptibility of *P.*

insidiosum to the antibacterial drug azithromycin macrolide has been demonstrated through *in vitro*^{9, 16, 18-21}, and *in vivo*^{9, 22} studies, as well as in the clinical treatment of ocular pythiosis.²⁸

The present study aimed to evaluate the susceptibility profile and to verify the morphological alterations in *P. insidiosum* isolates treated with amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone or in combination.

Material and methods

Pythium insidiosum isolates

Eighteen Brazilian clinical isolates of *P. insidiosum* (17 equines and 1 canine) and standard strains CBS 119455 and CBS 575.85 from human and equine donors, respectively, were used in the study. All isolates were previously molecularly characterized according to Weiblen et al.²⁹

Antimicrobial drugs

Amorolfine hydrochloride (AMR, Acros Organics, Branchburg, NJ, USA) and azithromycin (AZM, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) were obtained commercially. AMR and AZM stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Working solutions were diluted in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich Co. St Louis, USA) and adjusted to pH 7.0 with morpholinopropanesulfonic acid buffer (MOPS; Inlab, Diadema, SP, Brazil) to produce final concentrations of 0.5 to 256 mg/L and 0.5 to 128 mg/L, respectively.

Inoculum preparation

The inocula consisted of *P. insidiosum* zoospores (2 to 3 x 10³ zoospores/mL) diluted 1:10 in RPMI 1640 broth, pH 7.0 (1 mL of the induction medium containing between 20,000

- 30,000 zoospores/mL plus 9 mL of RPMI medium). Only viable zoospores were used, that is, those that did not show germ tube development. The zoospores were obtained by the zoosporogenesis process described by Pereira et al.¹³, with modifications. Briefly, *P. insidiosum* isolates previously cultured in corn meal agar (CMA) were placed onto Petri dishes containing clarified V8 agar and incubated at 37°C for 2 days. Later, sterile grass fragments (*Paspalum notatum*) were added to the culture and the plates were again incubated at 37 °C for 2 days. *P. notatum* fragments containing *P. insidiosum* were transferred to a Petri dish containing 20 mL of induction medium and incubated at 37 °C for 24 hours. After this period, the Petri dishes were rotated for five minutes at 3,000 rpm and the free zoospores in the induction medium were counted in a Neubauer chamber under optical microscopy (100 and 400 x).

In vitro susceptibility testing

Susceptibility assessments were performed using the broth microdilution method, according to the M38-A2 protocol standards of the Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI)³⁰, adapted by Pereira et al.¹³ The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined after 24 h of incubation at 37 °C by observation of the presence or absence of mycelial growth compared to mycelial growth without the drug (positive control). MIC for all *P. insidiosum* isolates were established according to the visualization of 100, 90, and 50 % inhibition of mycelial growth, respectively. After MIC determination, 0.1 mL aliquots were taken from each well without growth and added to tubes containing 0.9 mL Sabouraud broth. The tubes were kept at 37 °C per 24 h to determine the minimum oomicidal concentration (MOC).

The AMR + AZM combination was evaluated using the broth dilution checkerboard technique. The microplates were incubated at 37 °C for 48 h. From the MIC obtained in the

individual tests, and all MIC obtained in the association, an analysis of the interactions between the drugs was performed based on the respective fractional inhibitory concentration index (FICI). The resulting FICI was interpreted as follows: synergistic, $FICI \leq 0.5$; indifferent, $FICI > 0.5$ and $= 4$; antagonistic, $FICI > 4$.³¹ The geometric mean (GM) was calculated for the MIC, MOC and FICI values. All tests were performed in triplicates.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

P. insidiosum (CBS 575.85) isolate was used for TEM analyses. Hyphae grown at a sub-lethal concentration (16 mg/L) of AMR and AZM were selected from *in vitro* susceptibility tests. As a control, *P. insidiosum* hyphae were used without AMR or AZM treatment. The preparation protocol adapted for oomycetes was described by Valente et al.²⁵ The hyphae were drained from the culture medium, fixed in 1 mL glutaraldehyde (2 %) and kept at 4 °C overnight. Then, the hyphae were washed twice with sterile distilled water (dH₂O) and three times with sodium cacodylate (0.1 M) sucrose (0.2 M) buffer, pH 7.4. The samples were then resuspended in osmium and sodium cacodylate buffer (0.4 M, pH 7.4) for 50 min. Afterwards, the pellets were washed with dH₂O and subjected to successive 5 minute baths of increasing concentrations of alcohol (50, 70 and 90 %). Subsequently, the samples were subjected to three alcohol baths (100 %) for 10 min, followed by two acetone washes for 10 min. The pellets were placed in a bath containing 1 mL acetone and 1 mL resin solution. The samples were then added to the resin and kept under constant stirring for one hour. Ultra-fine 60 nm and semi-fine 1µm cuts were made in Leica Ultracut UCT cacodylate buffer, and TEM generated images were observed under a JEOL JEM-1400 microscope.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Oomycete sample preparation was performed according to Valente et al.²⁵ *P. insidiosum* (CBS 575.85) hyphae resulting from treatment with a sub-lethal (16 mg/L) concentration (an AMR concentration where there was hyphal growth immediately after MIC) in the susceptibility test and a hyphal growth control (without AMR treatment) were fixed in 1 mL glutaraldehyde (2.5 %) and kept at 4 °C for 48 h. Later, the hyphae were washed in dH₂O and placed in several baths (20 µL) containing increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 95, and 100 %) for 60 seconds each. The hyphae were then drained on microscope cover slips and dried in an oven at 37 °C for 24 h. After drying, the samples were transferred to stubs and covered with gold palladium (60 s, 1.8 mM, 2.4 kV), and visualized at 10 and 15 kV at 2000 to 4300 x magnitude.

Results

In vitro susceptibility results for *P. insidiosum* isolates are presented in Table 1. AMR MIC values ranged from 16 to 64 mg/L (GM, 34.30 mg/L) and AZM MIC values ranged from 8 to 64 mg/L (GM, 18.38 mg/L). The MIC required to inhibit growth of 50 % (MIC₅₀) and 90 % (MIC₉₀) of the isolates were 32 and 64 mg/L for AMR, and 16 and 32 mg/L for AZM, respectively. Results for MOC were the same as for MIC for both drugs evaluated. Interpretation of drug combination was based on the lowest FICI (Table 2) and it was observed that the combination of AMR and AZM demonstrated no synergistic interactions. However, this combination demonstrated antagonistic (GM 59.8 %) and indifferent (GM 36.2 %) interactions.

P. insidiosum (CBS 575.85) ultrastructure was observed using TEM (Figure 1). In the control sample (AMR- or AZM-untreated), the presence of a thick cell wall with a homogeneous appearance was identified; intracellular organelles were also visualized (Figure 1-A and 1-C). When *P. insidiosum* hyphae were treated with AMR (Figure 1-D), the

accumulation of fine, granular material occupying a large area of the cytoplasm was observed. The smooth endoplasmic reticulum was dilated, and it was not possible to observe the intracytoplasmic vacuoles. At the ends of the hyphae, the cell wall appeared thickened and the plasma membrane was not clearly observed. In AZM treatment, *P. insidiosum* hyphae displayed plasma membrane leaflets which were spaced apart due to the accumulation of homogeneous-looking material (Figure 1-B). Areas with ribosome accumulations and an absence of mitochondria in the cytoplasm were also identified.

Images of *P. insidiosum* (CBS 575.85) hyphae (treated and untreated with AMR) obtained using SEM are shown in Figure 2. The untreated oomycete hyphae (negative or growth control) had a turgid appearance and no morphological changes (Figure 2-A). In contrast, the AMR-treated isolate contained hyphae with a rough surface and a retracted and brittle aspect (Figure 2-B).

Discussion

The search for an effective treatment for pythiosis in humans and animals has challenged many researchers, and the antifungals tested thus far have shown variable results with respect to anti-*P. insidiosum* action.^{10, 13, 32-35} To date, research on the effects of antifungal agents against *P. insidiosum* has not considered the morpholine antifungal amorolfine hydrochloride. This is the first study to verify AMR antimicrobial activity against this prominent pathogen. The results show that the AMR was able to inhibit *in vitro* growth of *P. insidiosum*, with MIC and MOC values ranging from 16 to 64 mg/L.

Previous studies have demonstrated that AMR has an effect on dermatophyte, yeast, filamentous, and dimorphic fungi.³⁶ Tamura et al.³⁷ described *in vitro* action of AMR against the genera *Trichophyton* (MIC ranging from 0.12 to 0.5 mg/L), *Microsporum* (0.06 to 0.25 mg/L), *Epidermophyton* (0.25 mg/L), and *Fusarium* (8 to > 64 mg/L). Growth inhibition was

also demonstrated against *Aspergillus fumigatus* (> 64 mg/L), *Geotrichum candidum* (1 to 2 mg/L) and *Scopulariopsis brevicaulis* (0.25 mg/L). Similarly, Sequeira-Oviedo et al.³⁸ and Barrantes-Ortiz et al.³⁹ reported the action of AMR against *Fusarium solani* and *Scopulariopsis* sp., with MIC ranging from 0.13 to 64 mg/L in both studies. Thus, the MIC found in this research is in agreement with those reported in the literature.

Currently, the use of AMR is limited to the topical treatment of mycoses.²⁷ This may prove advantageous when considering the application of this drug in *P. insidiosum* infections, since AMR may have therapeutic potential against cutaneous and subcutaneous forms of pythiosis.

The macrolide antimicrobial AZM presented MIC and MOC ranging from 8 to 64 mg/L. These results were similar to those of previous studies that evaluated the susceptibility of *P. insidiosum* to this macrolide^{9, 16, 18-21}. Additionally, Loreto et al.²² proposed an experimental model of vascular/disseminated pythiosis in immunosuppressed mice and AZM therapy alone significantly reduced animal mortality.

In the combination study of both drugs, AMR and AZM, no synergistic interaction was identified. Previous *in vitro* studies have demonstrated synergism in the combination of AZM with micafungin¹⁸, carvacrol, thymol¹⁹, minocycline, tigecycline, and clarithromycin.⁹ Moreover, Jesus et al.⁹ demonstrated the success of *in vivo* therapy using AZM alone, or in combination with minocycline, in the treatment of subcutaneous pythiosis in rabbits. In the present study, antagonism was observed in 59.8 % of isolates, indicating that the combination of both drugs is not advantageous in the treatment of *P. insidiosum* infection.

AMR demonstrates an antifungal mechanism of action based on inhibition of the enzymes delta-14-reductase and delta-7,8-isomerase. These enzymes are involved in ergosterol biosynthesis. This inhibition results in the accumulation of ergosterol and other metabolites that lead to the alteration of fungal cell membrane permeability.^{27, 36} Based on the

results observed in this study, AMR produced alterations in *P. insidiosum* hyphae. After treatment with AMR, changes in the surface of *P. insidiosum* hyphae were observed using SEM. The TEM analysis identified changes in intracellular organelles and thickening of the cell wall of the oomycete.

In prokaryotic organisms, the mechanism of action of AZM is based on inhibition of protein synthesis.^{40, 41} It is assumed that the mechanism of action of AZM against *P. insidiosum* may be similar to the action of this drug against another oomycete, *Pythium ultimum*. In this instance, AZM reduces amino acid incorporation and transport, thus inhibiting protein synthesis.⁴² In this study, TEM analysis demonstrated that *P. insidiosum* hyphae treated with AZM showed changes in their plasma membrane and intracellular organelles. Areas where accumulation of ribosomes occurred were also highlighted. The results obtained here reinforce previous data relating to the efficacy of AZM against *P. insidiosum*, and the potential use of AMR to control this difficult pathogen. Additionally, the replacement of drugs evaluated in this research makes it possible to increase the anti-*P. insidiosum* therapeutic arsenal.

CONCLUSION

This is the first study demonstrating the anti-*P. insidiosum* activity of morpholine antifungal amorolfine hydrochloride. AMR and AZM have an inhibitory action on this microorganism. However, combination therapy using both drugs is not advantageous for use in the treatment of infections caused by this important pathogen oomycete. Further investigation is necessary to reveal the full therapeutic effects of AMR for the clinical treatment of cutaneous and subcutaneous pythiosis.

Acknowledgements

The authors are grateful to Simone Silveira da Silva from Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Rudmar Krumreick and Caroline Ruas from Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) at Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Additionally, this work was supported by Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq [grant number 420538/2018-6, Projeto Universal, 02/2018]; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS [grant number 17/2551-0000951-7, Programa Pesquisador Gaúcho – PqG, 02/2017]; and Coordenação de Pessoal de Nível Superior – CAPES [financial code 001]. L.B.I, P.C.S. and C.W. thank the scholarships received from Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interest Statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

REFERENCES

1. Gaastra W, Lipman LJ, De Cock AW et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol.* 2010; 146: 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.019>
2. McCarthy CGP, Fitzpatrick DA. Phylogenomic reconstruction of the oomycete phylogeny derived from 37 genomes. *MSphere.* 2017; 2:e00095-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00095-17>
3. Santos CEP, Ubiali DG, Pescador CA, Zanette RA, Santurio JM, Marques LC. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian Pantanal and nearby areas: results of 76 cases. *J Equine Vet Sci.* 2014; 34:270–274. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.06.003>

4. Weiblen C, Machado G, Jesus FPK et al. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. *Cienc Rural*. 2016; 46: 26–131. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150056>
5. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2006; 43:569–576. <https://doi.org/10.1086/506353>
6. Lerksuthirat T, Sangcakul A, Lohnoo T, Yingyoung W, Rujirawat T, Krajaejun T. Evolution of the sterol biosynthetic pathway of *Pythium insidiosum* and related oomycetes contributes to antifungal drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61:e02352-16. 2-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02352-16>
7. Argenta JS, Alves SH, Silveira F et al. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol*. 2012; 157:137–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.003>
8. Loreto ÉS, Alves SH, Santurio JM, Nogueira CW, Zeni G. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol*. 2012; 156: 222–226. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.008>
9. Jesus FPK, Loreto ES, Ferreiro L et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin, or tigecycline against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 60:87–91. <https://doi.org/10.1128/AAC.01480-15>
10. Pereira DIB, Botton SA, Azevedo MI et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. *Mycopathologia*. 2013; 176:309–315. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9683-7>

11. Cardona-Alvarez J, Vargas-Viloria M, Patarroyo-Salcedo J. Cutaneous pythiosis in equines treated with triamcinolone acetonide. Part 1. Clinical characterization. *Rev MVZ Córdoba*. 2016; 21: 5511-5524 [Pythiosis cutánea en equinos tratados con acetónida de triamcinolona. Parte 1. Caracterización clínica]. <https://doi.org/10.21897/rmvz.825>
12. SUSAENGRAT N, TORVORAPANIT P, PLONGLA R et al. Adjunctive antibacterial agents as a salvage therapy in relapsed vascular pythiosis patients. *Int J Infect Dis*. 2019; 88:27-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.032>
13. PEREIRA DIB, SANTURIO JM, ALVES SH et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 1168–71. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm332>
14. CAVALHEIRO AS, ZANETTE RA, SPADER TB et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol*. 2009; 137:408–411. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.036>
15. VALENTE JSS, FONSECA AOS, DENARDI LB et al. *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. *J Appl Microbiol*. 2016; 4: 998–1003. <https://doi.org/10.1111/jam.13234>
16. LORETO ÉS, MARIO DAN, DENARDI LB, ALVES SH, SANTURIO J. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:3588–3590. <https://doi.org/10.1128/AAC.01586-10>
17. MAHL DL, JESUS FPK, LORETO ÉS et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56:4021–4023. <https://doi.org/10.1128/AAC.00073-12>

18. Jesus, FPK, Ferreiro L, Loreto ÉS et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 5621–5625. <https://doi.org/10.1128/AAC.02349-14>
19. Jesus FPK, Ferreiro L, Bizzi KS et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med.* 2015; 25: e89-93. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.10.023>
20. Itaquí SR, Verdi CM, Tondolo JSM. *In vitro* synergism between azithromycin or terbinafine and topical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 5023–5025. <https://doi.org/10.1128/AAC.00154-16>
21. Loreto ES, Tondolo JSM, Oliveira DC, Santurio J, Alves SH. *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62:e01678-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01678-17>
22. Loreto, ÉS, Tondolo JMS, Jesus FPK et al. Efficacy of azithromycin and miltefosine in experimental systemic pythiosis in immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 63: e01385-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01385-18>
23. Worasilchai N, Chindamporn A, Plongla R et al. *In vitro* susceptibility of antibacterial agents against Thai *Pythium insidiosum* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; <https://doi.org/10.1128/AAC.02099-19>.
24. Fonseca AOS, Pereira DIB, Jacob RG et al. *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some *Lamiaceae* Family species. *Mycopathologia.* 2015; 179:253–258. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9841-6>

25. Valente JSS, Braga CQ, Brasil CL et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. *Med Mycol.* 2019; 57: 858–863. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy147>
26. Krajaejun T, Lohnoo T, Yingyong W et al. The repurposed drug disulfiram inhibits urease and aldehyde dehydrogenase and prevents in vitro growth of the oomycete *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63:e00609-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00609-19>
27. Polak A. Preclinical data and mode of action of amorolfine. *Dermatology.* 1992; 184: 3-7. <https://doi.org/10.1159/000247588>
28. Chatterjee S, Agrawal D. Azithromycin in the management of *Pythium insidiosum* keratitis. *Cornea.* 2018; 37:e8–e9. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001419>
29. Weiblen C, Azevedo MI, Ianiski LB et al. Genotyping of South American clinical isolates of *Pythium insidiosum* based on single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR. *Cienc Rural.* 2019; 49:01 e20180744. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180744>
30. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi—Second Edition: Approved Standard M38-A2. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
31. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 693-715. <https://doi.org/10.1128/aac.48.3.693-715.2004>
32. Shenep JL, English BK, Kaufman L et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clin Infect Dis.* 1998. 27, 1388–1393. <https://doi.org/10.1086/515042>

33. Fujimori M, Lopes ER, Lima SR et al. *Pythium insidiosum* colitis in a dog: treatment and clinical outcome. *Cienc Rural*. 2016; 46: 526-529. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150081>
34. He H, Liu H, Chen X, Wu J, He M, Zhong X. Diagnosis and treatment of *Pythium insidiosum* corneal ulcer in a chinese child: A case report and literature review. *Am J Case Rep*. 2016; 17: 982-988. <https://doi.org/10.12659/AJCR.901158>
35. Carvalho AM, Munhoz TCP, Toma HS et al. The use of fluconazole associated with surgical excision in the treatment of equine cutaneous pythiosis. *Semina: Ciênc Agrár*. 2019; 40: 3079-3088. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3079>
36. Polak-Wyss A. Mechanism of action of antifungals and combination therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1995; 4: 11–16.
37. Tamura T, Asahara M, Yamamoto M et al. *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. *Microbiol Immunol*. 2014; 58: 1–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12109>
38. Sequeira-Oviedo PM, Lozada-Alvarado S, Salas-Campos I, Jaikel-Viquez D. Antimicrobial susceptibility of *Fusarium solani* isolates from onychomycosis. *Dermatol Rev Mex*. 2017; 61:197–205 [Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Fusarium solani* provenientes de onicomycosis].
39. Barrantes-Ortiz N, Lozada-Alvarado S, Gross NT, Jaikel-Viquez D. *In vitro* susceptibility to antifungals of *Scopulariopsis* sp isolates from onychomycosis. *Dermatol Rev Mex*. 2019; 63:261–267 [Susceptibilidad *in vitro* a antifúngicos de aislamientos de *Scopulariopsis* sp provenientes de onicomycosis].
40. Parnham MJ, Haber VE, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications.

Pharmacology & Therapeutics. 2014; 143: 225-245.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.003>

41. Kagkellaris KA, Makri OE, Georgakopoulos CD, Ponayiotakopoulos GD. An eye for azithromycin: review of the literature. *Ther Adv Ophthalmol.* 2018; 10:1–14.

<https://doi.org/10.1177/2515841418783622>

42. Rawn CD, Van Etten JL. Mechanism of antibacterial antibiotic sensitivity in *Pythium ultimum*. *J Gen Microbiol.* 1978; 108:133–139. [https://doi.org/10.1099/00221287-](https://doi.org/10.1099/00221287-108-1-13)

108-1-13

Table 1. *In vitro* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin against *Pythium insidiosum* isolates (n=20).

Agent		Number of isolates (%) with the following MIC/MOC (mg/L)									MIC Range (mg/L)	GM (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)
		1	2	4	8	16	32	64	128	256				
Amorolfine hydrochloride	MIC ⁰	0	0	0	0	3 (15%)	12 (60%)	5 (25%)	0	0	16-64	34,30	32	64
	MIC ¹	0	0	0	4 (20%)	11 (55%)	5 (25%)	0	0	0	8-32	17,15	16	32
	MIC ²	0	4 (20%)	11 (55%)	5 (25%)	0	0	0	0	0	2-8	4,29	4	8
	MOC	0	0	0	0	2 (10%)	13 (65%)	5 (25%)	0	0	16-64	35,51	-	-
Azithromycin	MIC ⁰	0	0	0	4 (20%)	10 (50%)	4 (20%)	2 (10%)	0	0	8-64	18,38	16	32
	MIC ¹	0	0	4 (20%)	10 (50%)	4 (20%)	2 (10%)	0	0	0	4-32	9,19	8	16
	MIC ²	4 (20%)	10 (50%)	4 (20%)	2 (10%)	0	0	0	0	0	1-8	2,30	2	4
	MOC	0	0	0	4 (20%)	7 (35%)	4 (20%)	5 (25%)	0	0	8-64	22,63	-	-

MIC, minimum inhibitory concentration; MOC, minimum oomicidal concentration; MIC⁰, 100% growth inhibitory concentration; MIC¹, 90% growth inhibitory concentration; MIC², 50% growth inhibitory concentration; MIC₅₀, minimum concentration to inhibit the growth of 50% of isolates; MIC₉₀, minimum concentration to inhibit the growth of 90% of isolates; GM, geometric mean.

Table 2. *In vitro* combination of amorolfine hydrochloride and azithromycin against *Pythium insidiosum* isolates (n=20).

Isolate	GenBank [#]	Isolate source	MIC _{AMR} (mg/L)	MIC _{AZM} (mg/L)	A (%)	I (%)	S (%)	FICI (GM range)
2H (CBS 119455)	EF016855	Human	32	16	56,5	43,5	0	3,72 (0,56-16)
4H (CBS 575.85)	AB971178	Equine	32	32	47,8	52,2	0	2,87 (0,53-12)
138	JN126285	Equine	32	16	59,1	40,9	0	3,87 (0,56-16)
142	MH813297	Equine	32	16	70,3	29,7	0	4,80 (1,06-16)
178	JN126295	Equine	32	16	79,4	20,6	0	5,62 (2,06-16)
187	JN126296	Equine	16	16	89,2	10,8	0	7,47 (2,06-24)
254	MH813300	Equine	32	8	65,9	34,1	0	5,28 (0,63-24)
260	JN126307	Equine	64	8	70,3	29,7	0	5,76 (1,13-20)
289	MT192477	Equine	64	32	46,9	53,1	0	2,85 (1,00-8)
290	KJ176713	Equine	32	8	67,4	32,6	0	5,30 (0,63-24)
291	MH813302	Equine	16	16	72,7	27,3	0	6,14 (1,13-24)
292	MT192478	Equine	32	64	50,0	50,0	0	3,36(1,06-10)
294	MT126182	Equine	16	16	73,3	26,7	0	5,91 (1,06-24)
295	MH813304	Canine	64	16	48,6	51,4	0	3,07 (0,56-12)
296	MH813305	Equine	64	16	55,5	44,5	0	3,17 (0,56-12)
337	MH813306	Equine	32	64	38,6	61,4	0	2,48 (0,52-10)
338	MT192479	Equine	32	32	48,8	51,2	0	2,99 (0,53-12)
347	MT192480	Equine	32	16	70,3	29,7	0	4,80 (1,06-16)
357	MN422143	Equine	32	32	46,9	51,0	2,1	2,59 (0,38-12)
361	MN422144	Equine	64	8	65,6	34,4	0	5,57 (1,13-20)

[#] GenBank accession number corresponding to rDNA (ITS) sequences; AMR, amorolfine hydrochloride; AZM, azithromycin; A, antagonism; I, indifference; S, synergism; MIC, minimum inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index; GM, geometric mean.

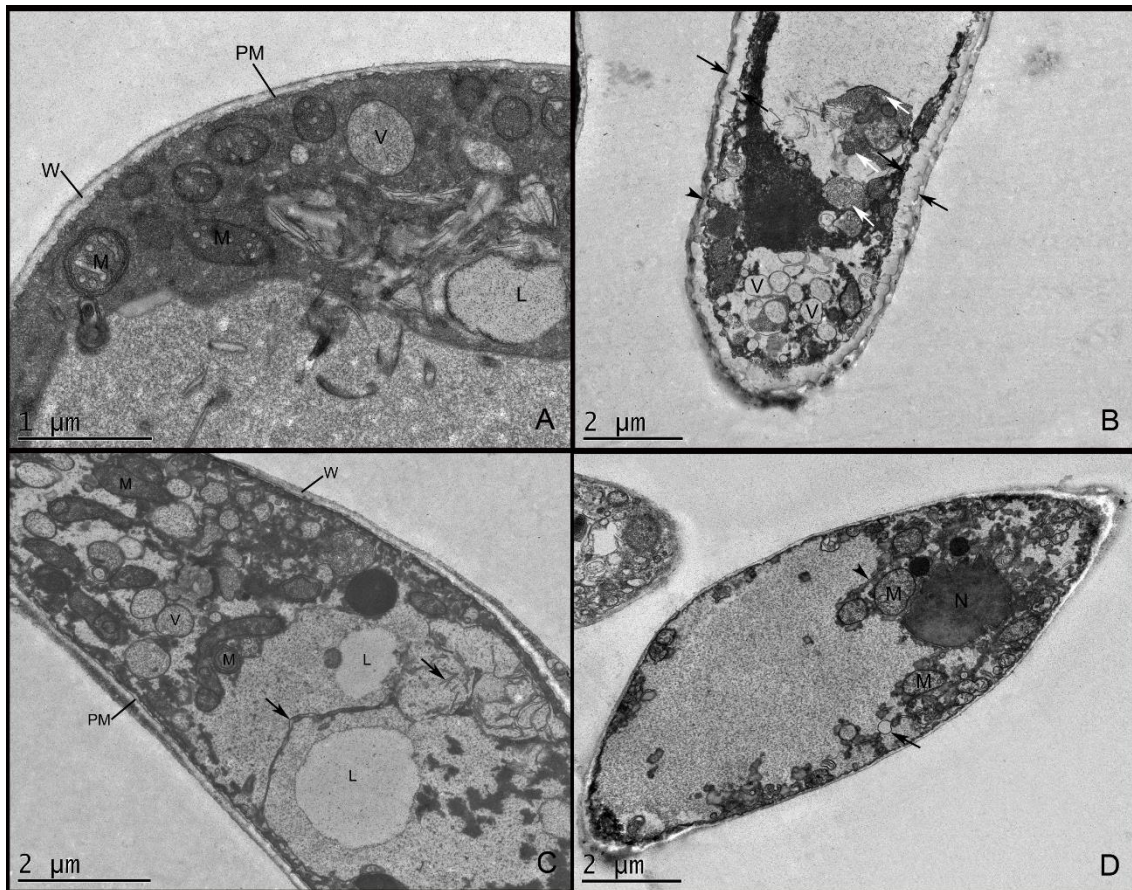


Figure 1. *Pythium insidiosum* ultrastructure (CBS 575.85) visualized in Transmission Electron Microscopy. (A) *Pythium insidiosum* hyphae (control). Lipid (L). Mitochondria (M). Vacuole (V). Cell wall (W). Plasma membrane (PM). (B) Azithromycin-treated *Pythium insidiosum* hyphae, with plasma membrane leaflets spaced apart due to the accumulation of homogeneous-looking material (between arrows). There is a point where the space between the membranes is apparently preserved (arrowhead). Presence of areas with ribosome accumulations (white arrow). Absence of mitochondria in the hyphal cytoplasm. Vacuoles (V). (C) *Pythium insidiosum* hyphae (control). Lipid (L). Mitochondria (M). Vacuole (V). Cell wall (W). Plasma membrane (PM). Smooth endoplasmic reticulum (arrow). (D) *Pythium insidiosum* hyphae treated with amorolfine hydrochloride, presenting accumulation of finely granular material occupying extensive area of cytoplasm. Note the absence of intracytoplasmic vacuoles. Dilated smooth endoplasmic reticulum (arrow) At the ends

of the hyphae the plasma membrane is not clearly observed and the cell wall is apparently thickened. Mitochondria (M). Core (N). Smooth endoplasmic reticulum (arrowhead).

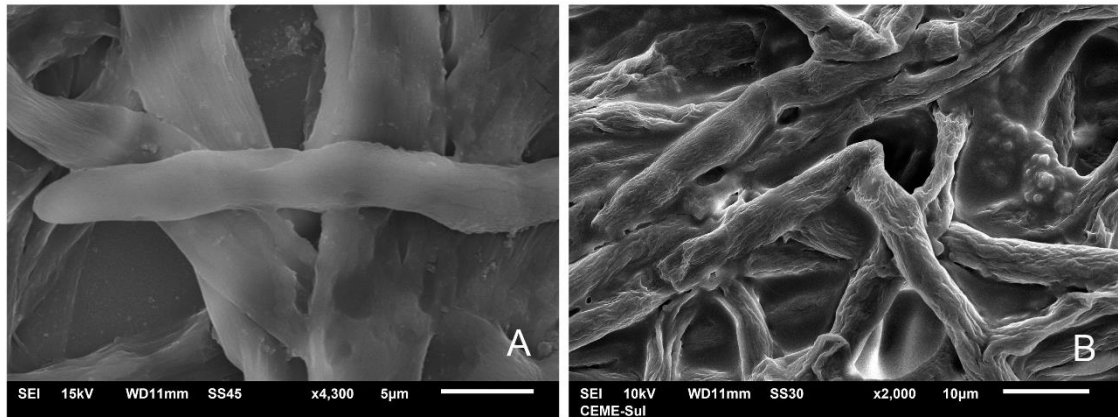


Figure 2. *Pythium insidiosum* ultrastructure (CBS 575.85) visualized in Scanning Electron Microscopy. (A) Turgid-looking *Pythium insidiosum* hyphae with integral surface. (B) *Pythium insidiosum* hyphae treated with amorolfine hydrochloride, with a roughened surface, with a retracted and brittle appearance.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação, pode-se concluir que:

- O cloridrato de amorolfina e a azitromicina, isoladamente, demonstraram ação inibitória contra o oomiceto *Pythium insidiosum*.

- A associação de ambos os fármacos não demonstrou atividade sinérgica contra *P. insidiosum*.

- Nas análises de microscopia eletrônica de transmitância e de varredura foi possível verificar alterações na superfície das hifas do micro-organismo, desorganização das organelas intracelulares, bem como modificações na membrana plasmática e na parede celular do oomiceto.

- Este é o primeiro estudo a demonstrar atividade de cloridrato de amorolfina anti-*P. insidiosum*. Pesquisas adicionais são necessárias para avaliar os efeitos terapêuticos deste fármaco para o tratamento clínico da pitiose.

6 REFERÊNCIAS

ADHIKARI, B. N. et al. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. **Plos One**, v. 8, n. 10, e75072, 2013.

ALEXOPOULOS, C. J. et al. Phylum Oomycota. In: **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 4th ed. 1996. Cap. 23, p. 683-737.

AMER, E. I.; EISSA, M. M.; MOSSALLAM, S. F. Oral azithromycin versus its combination with miltefosine for the treatment of experimental Old World cutaneous leishmaniasis. **Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology**, v.40, n.2, p. 475-484, 2016.

ARAÚJO, M. J.; BOSCO, S. M.; SFORCIN, J. M. *Pythium insidiosum* inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 863–869, 2016.

ARGENTA, J. S. et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 2, 767-769, 2008.

BERRYESSA, N. A. et al. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 1065-1069, 2008.

BEZERRA JÚNIOR, P. S. et al. Equine intestinal pythiosis in Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 2, p. 481-483, 2010.

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

BOSSEBOEUF, E. et al. Azithromycin inhibits the replication of Zika Vírus. **Journal of Antivirals & Antiretrovirals**, v. 10, n. 1, p. 6-11, 2018.

BOSCO, S. M. G. et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715-8, 2005.

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

BROWN, T. A et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 1463-1468, 2008.

CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 3710-3713, 2011.

CARDONA-ÁLVAREZ, J.; REZA, L.; VERGARA, O. Pythiosis cutânea equina en córdoba, Colombia. Reporte de cinco casos. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. 20. n. 6, p. 590 – 594, 2010.

CARDONA ÁLVAREZ, J.; VARGAS VILORIA, M.; PERDOMO AYOLA, S. Pitiose cutânea em equinos: uma revisão. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 8, n. 1, p. 104-113, 2013a.

CARDONA-ÁLVAREZ, J.; VARGAS, M.; PERDOMO, S. Evaluación clínica e histopatológica de la pitiosis cutânea en burros (*Equus asinus*). **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 25, p. 9-19, 2013b.

CARDONA-ÁLVAREZ, VARGAS-VILORIA, M.; PATARROYO-SALCEDO, J. Pythiosis cutânea em equinos con acetona de triamcinolona. **Revista MVZ Córdoba**, v.21, n. 3, p. 5511-5524. 2016.

CARMO, P.M.S. et al. Cutaneous Pythiosis in a Goat. **Journal of Comparative Pathology**, n.1-3, p. 2014.

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

CARRILLO-MUÑOZ A. J. et al. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n.2, p. 49-56, 2010.

CARVALHO, A. M. et al. The use of fluconazole associated with surgical excision in the treatment of equine cutaneous pythiosis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6, p. 3079-3088, 2019.

CAVALHEIRO, A. S. et al. *In Vitro* Activity of Terbinafine Combined with Caspofungin and Azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2136-2138, 2009a.

CAVALHEIRO, A. S. et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3-4, p. 408-411, 2009b.

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

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

DE HAAN, J.; HOOBKAMER, L. J. Hypho-mycosis destrues. **Veeartsennijkundige Bladen voor Nederlandsch-Indie**, v. 13, p. 350-374, 1901.

DICK, M. W. Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts of the Marine Straminipilous Protist, the Plasmodiophorids and Similar Organisms. **Kluwer Academic Publishers**, London, England, p. 67, 2001.

DINOS, G. P. Review article: The macrolide antibiotic renaissance. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 2967–2983, 2017.

DYKSTRA, M. J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**, v. 37, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1968-1975, 2015.

FENG, X.; XIONG, X.; RAN, Y. Efficacy and tolerability of amorolfine 5% nail lacquer in combination with systemic antifungal agents for onychomycosis: A meta-analysis and systematic review. **Dermatologic Therapy**, v.30, e12457, 2017.

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, p. 253–258, 2015.

FORTIN, J. S.; CALCUTT, M. J.; KIM, D.Y. Sublingual pythiosis in a cat. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 59, n. 1, p. 63, 2017.

FRADE, M. T. S. et al. Pythiosis in dogs in the semiarid region of Northeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 485-490, 2017.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**. v. 146, p. 1-16, 2010.

GABRIEL, A. L. et al. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.583-587, 2008.

GALIZA, G. J. N. et al. Occurrence of mycoses and pythiosis in domestic animals: 230 cases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 224-232, 2014.

GIELEN, V.; JOHNSTON, S. L.; Edwards, M. R. Azithromycin induces anti-viral responses in bronchial epithelial cells. **European Respiratory Journal**, v. 36, n. 3, p. 646 - 654, 2010.

GRECCO, F. B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 938-942, 2009.

GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 147-152, 2002.

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

HARIA, M.; BRYSON, H. M. Amorolfine: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of onychomycosis and other superficial fungal infections. **Drugs**, v. 49, n. 1, p. 103-120, 1995.

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

HENDRIX, J. W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**, v. 144, p. 1028-1029, 1964.

HENSEL, P. et al. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 2, p. 215-197, 2003.

HTUN, Z. M. et al. An initial survey of 150 horses from Thailand for anti-*Pythium insidiosum* antibodies. **Research Square**, 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-29511/v1>

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

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

INTARAMAT, A. et al. Protein A/G-based immunochromatographic test for serodiagnosis of pythiosis in human and animal subjects from Asia and Americas. **Medical Mycology**, v. 54, n. 6, p. 641-647, 2016.

ITAQUI, S. R. et al. *In vitro* synergism between azithromycin or terbinafine and topical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 5023-5025, 2016.

JESUS, F. P. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n.v9, p. 5621-5625, 2014.

JESUS, F. P. et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 87-91, 2015a.

JESUS F. P. K. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, e89-93, 2015b.

JIANG, R. H. Y.; TYLER, B. M. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, n. 1, p. 295-318, 2012.

JINDAYOK, T. et al. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 7, p. 1047-1051, 2009.

KAGEYAMA, K. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 4, p. 314-326, 2014.

KAGKELARIS, K. A. An eye for azithromycin: review of the literature. **Therapeutic Advances in Ophthalmology**, v. 10, p. 1-14, 2018.

KAUFMAN L., MENDOZA L., STANDARD P. G. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p. 1887-1890, 1990.

KAUFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**, v. 143, n. 1, p. 3-7, 1998.

KEOPRASOM, N. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient presenting as bilateral leg ulcers. **Medical Mycology Case Reports** 2, p. 25–28, 2013.

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

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

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

KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Disease**, v. 19, S1–7, 1994.

LARSSON, C. E. et al. Pitiose canina - Aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. **Anais...Gramado: XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. P.155, 1997.

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

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

LERKSUTHIRAT, T. et al. Evolution of the sterol biosynthetic pathway of *Pythium insidiosum* and related oomycetes contributes to antifungal drug resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.61, e02352-16, 2017.

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

LORETO, É. S. et al. Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v.156, p. 222–226, 2012.

LORETO, E. S. et al. New insights into the in vitro susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7534-7537, 2014.

LORETO, É. S. et al. In vitro activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, e01678-17, 2018a.

LORETO, É.S. et al. Efficacy of azithromycin and miltefosine in experimental systemic pythiosis in immunosuppressed mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, e01385-18, 2018b.

LUIS-LEÓN, J.; PÉREZ, R. Pythiosis: Una patología emergente en Venezuela. **Salus online**, v. 15, n. 1, p.79–94, 2011.

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

MAIA, L. A. et al. Cutaneous pythiosis in a donkey (*Equus asinus*) in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n.4, p. 436–439, 2016.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Equine diseases in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 205–210, 2014.

MARQUES, S.A. et al. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.5, p. 483-485, 2006.

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

MCCARTHY, C. G. P; FITZPATRICK, D. A. Phylogenomic reconstruction of the oomycete phylogeny derived from 37 genomes. **MSphere**, v. 2, e00095-17, 2017.

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

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2967–2973, 1993.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal De Mycologie Medicale**, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

- MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.
- MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal diseasemimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**, v. 47, n. 1-2, p. 14-23, 2004.
- MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 6, p. 477-486, 2005.
- MENDOZA, L.; VILELA, R. The Mammalian Pathogenic Oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, p. 98-208, 2013.
- MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 377-382. 1981.
- MILLER, R. I. Investigation into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v. 81, p. 23-28, 1983.
- MILLER, R. I.; OLCOTT, B.M.; ARCHER, M. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, p. 984-986, 1985.
- MOORE-LANDECKER, J. Zoosporic fungi. In: _____. **Fundamentals of the fungi**. 4. Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Cap. 3, o. 33-79.
- MULLER J.; POLAK, A.; MELCHINGER, W. Influence of amorolfine on the morphology of *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 17, p. 18-25, 1992.
- NGUYEN, M. H. et al. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by azithromycin against *Aspergillus* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, p. 846-848, 1997.
- NISHIYAMA, Y. et al. Morphological changes associated with growth inhibition of *Trichophyton mentagrophytes* by amorolfine. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 17, p. 13-17, 1992.
- PARNHAM, M. J. et al. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.143, p. 225-245, 2014.
- PEREIRA, D. I. B. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1168-1171, 2007.
- PEREIRA, D. I. B. et al. Canine Gastrointestinal Pythiosis Treatment by Combined Antifungal and Immunotherapy and Review of Published Studies. **Mycopathologia**, v.176, p. 309-315, 2013.

PERMPALUNG, N. et al. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 1885–1892, 2015.

PERMPALUNG, N. et al. Human Pythiosis: Emergence of Fungal-Like Organism. **Mycopathologia**, 2019. DOI: 10.1007/s11046-019-00412-0

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

PESSOA, C. R. M. et al. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 24, p. 1133-1136, 2013.

POLAK, A. Preclinical data and mode of action of amorolfine. **Dermatology**, v. 184, p. 3-7, 1992.

POLAK, A. Mechanism of action of antifungals and combination therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 4, p.11–16, 1995.

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

PRACHARKTAM, R. et al. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2661–2662, 1991.

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

PRATA, A. et al. Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, n. 36, p. 65-69, 2003.

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

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

RAWN, C. D.; VAN ETTEN, J. L. Antibiotic inhibition of protein synthesis in *Pythium ultimum*. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, v. 4, p. 128-129, 1977.

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

REIS-GOMES, A. et al. Epidemiology of mycoses, pitiosis and micotoxycosis in horses in southeastern Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p.1110-1116, 2018.

ROMERO, A. et al. Equine pythiosis in the eastern wetlands of Uruguay. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 469-475, 2019.

ROSSATO, C. K. et al. Pythiosis with atypical location in the soft palate in a horse in Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 641-643, 2018.

RUIRAWAT, T. et al. Single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR for identification and genotyping of the oomycete *Pythium insidiosum* from humans, animals and the environment. **Infection, Genetics and Evolution**. v.54, p.429- 436, 2017.

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

SANTOS, C. E. P.; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Pitiose em animais de produção no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1083-1089, 2011a.

SANTOS, C. E. P. et al. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 1397-1399, 2011b.

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

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

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

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

SANTURIO, J. M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 47-50, 2006a.

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

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

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

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

SEQUEIRA-OVIEDO, P. M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Fusarium solani* isolates from onychomycosis. **Dermatología Revista Mexicana**, v. 61, p.197–205, 2017.

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

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

SOARES, L. M. C. et al. Pitiose subcutânea felina. **Ciência. Rural**, v. 49, n. 3, e20180448, 2019.

SOUTO, E.P.F. et al. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.3, p.1081-1084, 2019.

SUDJARITRUK, T., SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases**. v. 11, n. 33, 2011.

SUTHIWONG, J.; THONGSRI, Y.; YENJAI, C. A new furanocoumarin from the fruits of *Scaevola taccada* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Natural Product Research**, v. 31, p. 453-459, 2017.

TAMURA, T. et al. *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 58, p. 1–8, 2014.

TARTOR, Y. H. et al. Equine pythiosis in Egypt: clinicopathological findings, detection, identification and genotyping of *Pythium insidiosum*. **Veterinary Dermatology**, 2020. <https://doi.org/10.1111/vde.12845>

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. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 7, n. 1, p. 43-54, 1996.

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, dez. 2013.

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

TONPITAK, W. et al. First confirmed case of nasal pythiosis in a horse in Thailand. **JMM Case Reports**, v.5, e005136, 2018.

TROLEZI, R. et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: in vitro and in vivo studies. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.16, n. 7, 2017.

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

VALENTE, J. S. S. et al. *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, p. 998–1003, 2016.

VALENTE, J. S. S. et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v. 57, p. 858–863, 2019.

VIANA, I. S. et al. Clinical and epidemiological study of 41 equine pythiosis cases occurred in the Northern Region Fluminense of Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 18, e18001, 2020.

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 219-224, 2011.

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

WEIBLEN, C. et al. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.46, n. 1, p. 26-131, 2016.

WEIBLEN, C. et al. Genotyping of South American clinical isolates of *Pythium insidiosum* based on single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR. **Ciência Rural**, v. 49, n.01, p. e20180744, 2019.

WORASILCHAI, N. et al. *In vitro* susceptibility of Thai *Pythium insidiosum* isolates to antibacterial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, e02099-19, 2020.

ZAMBRANO, C. G. et al. Isolation and characterization of *Pythium* species from swampy areas in the Rio Grande do Sul, Brazil, and evaluation of pathogenicity in an experimental model. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 459-464, 2017.

ZARO, D. et al. *Pythium insidiosum* em equino: Relato de caso. **Pubvet**, v.12, n.12, a223, p.1-8, 2018.

ZIMMERMANN, C. E. P. et al. *In vivo* effect of minocycline alone and in combination with immunotherapy against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108616>

ZUCKERMAN, J. M. Macrolides and ketolides: aithromycin, clarithromycin, telithromycin. **Infectious Disease Clinics of North America** v. 18, p. 621-649, 2004.

7 ANEXO

Comprovante de autorização da Oxford Univeristy Press para reprodução, no documento de dissertação, do artigo publicado no periódico *Medical Mycology*.

09/07/2020

RightsLink Printable License

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 09, 2020

This Agreement between Universidade Federal de Santa Maria -- Sonia Botton ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number 4864780873597

License date Jul 09, 2020

Licensed content
publisher Oxford University Press

Licensed content
publication Medical Mycology

Licensed content
title *In vitro*: Antimicrobial effect anti-*P. insidiosum*

Licensed content
author Ianiski, Lara Baccarin et al.

Licensed content
date May 13, 2020

Type of Use Thesis/Dissertation

Institution name

Title of your work Dr

Publisher of your
work Universidade Federal de Santa Maria

09/07/2020

RightsLink Printable License

Expected
publication date Aug 2020

Permissions cost 0.00 USD

Value added tax 0.00 USD

Total 0.00 USD

Title Dr

Institution name Universidade Federal de Santa Maria

Expected
presentation date Aug 2020

Order reference
number myaa032

Portions Text of this manuscript and the following portions: table 1 on page 3, table 4 on page 4, figure 1 and figure 2 on page 5.

Universidade Federal de Santa Maria
General Delivery

Requestor
Location

Santa Maria, RS
Brazil
Attn: Universidade Federal de Santa Maria

Publisher Tax ID GB125506730

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL
FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.

2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

12. Other Terms and Conditions:

09/07/2020

RightsLink Printable License

v1.4

Questions? customer-care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.
