

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

Paula Cristina Stibbe

**ATIVIDADE ANTI-*Pythium insidiosum* E TOXICIDADE DE
MEFENOXAM E PYRACLOSTROBIN**

Santa Maria, RS
2021

Paula Cristina Stibbe

**ATIVIDADE ANTI-*Pythium insidiosum* E TOXICIDADE DE MEFENOXAM E
PYRACLOSTROBIN**

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
2021

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

Stibbe, Paula Cristina
ATIVIDADE ANTI-Pythium insidiosum E TOXICIDADE DE
MEFENOXAM E PYRACLOSTROBIN / Paula Cristina Stibbe.-
2021.
46 p.; 30 cm

Orientadora: Sônia de Avila Botton
Coorientador: Janio Morais Santurio
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. Pythium insidiosum 2. Pitiose 3. Suscetibilidade
4. Toxicidade 5. Oomiceto I. Botton, Sônia de Avila II.
Santurio, Janio Morais III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, PAULA CRISTINA STIBBE, 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.

Paula Cristina Stibbe

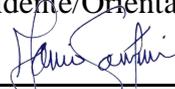
ATIVIDADE ANTI-*Pythium insidiosum* E TOXICIDADE DE MEFENOXAM E PYRACLOSTROBIN

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**.

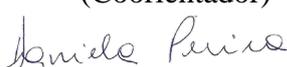
Aprovado em 27 de agosto de 2021:



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



Janio Morais Santurio, Dr. (UFSM)
(Coorientador)



Daniela Isabel Brayer Pereira, Dra. (UFPel)

Santa Maria, RS
2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Léia Maria Stibbe, que é e sempre será meu exemplo de força, resiliência e bondade.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao incentivo e o auxílio de inúmeras pessoas, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e agradeço, em especial:

- a mim mesma, por não desistir e por acreditar na minha capacidade de seguir em frente;
- a minha família, por me apoiar sempre, de todas as formas possíveis e acreditar em mim;
- aos amigos que estiveram comigo nesta jornada, me apoiando e deixando os dias mais leves;
- ao grupo de pesquisa que me acolheu desde a graduação e me trouxe muitas oportunidades de crescimento humano e profissional;
- a minha orientadora Sônia de Avila Botton e ao coorientador Janio Morais Santurio, pela disponibilidade, apoio e por todas as contribuições;
- aos que contribuíram ativamente nas etapas de construção deste trabalho, dentre os quais, cito: Lara Baccarin Ianiski, Carla Weiblen, Pauline Christ Ledur, Laura Bedin Denardi, Vanessa Schopf Machado, Marina Lopes Machado, Aline Fontanella Maciel, Daniela Isabel Brayer Pereira, Luís Antonio Sangioni, Natália de Freitas Daudt, Mauro Pereira Soares;
- a todos os que já passaram pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), pela construção de conhecimento e pesquisa, pela inspiração e troca de experiências e por ter aberto caminhos para que novas pesquisas possam ser desenvolvidas;
- à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por ser berço de pesquisa e conhecimento e por trazer oportunidades de crescimento a tantos;
- ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela oportunidade de integração e aprendizagem;
- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código financeiro 001), 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.

Seja menos curioso sobre as pessoas e mais curioso sobre ideias.
(Marie Curie)

RESUMO

ATIVIDADE ANTI-*Pythium insidiosum* E TOXICIDADE DE MEFENOXAM E PYRACLOSTROBIN

AUTORA: Paula Cristina Stibbe

ORIENTADORA: Sônia De Avila Botton

A pitiose é uma infecção causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*. A doença acomete diferentes espécies animais e os humanos, ocorrendo em várias regiões do mundo. Destacam-se o Brasil, com prevalência em animais e a Tailândia, com prevalência em humanos. Essa infecção geralmente torna-se fatal, pois não existe uma terapia padrão que seja efetiva nas diferentes espécies afetadas. A busca por diferentes opções de tratamento tem demonstrado a ação anti-*P.insidiosum in vitro* de diversas classes farmacológicas, principalmente os antimicrobianos. Os resultados *in vivo*, porém, são conflitantes e cada espécie responde de forma distinta aos tratamentos. Na busca por novas opções terapêuticas, este trabalho avaliou dois fitoantifúngicos através da técnica de microdiluição em caldo. Foram testados 18 isolados clínicos e três cepas padrão de *P. insidiosum* (n=21) frente aos compostos mefenoxam e pyraclostrobin, a fim de verificar o perfil de suscetibilidade e definir a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração oomicida mínima (COM) de todos os isolados. Além disso, as hifas controle de *P. insidiosum* e as hifas expostas à concentração subletal do tratamento com mefenoxam e pyraclostrobin foram avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificar possíveis diferenças estruturais e morfológicas. Adicionalmente, verificou-se a toxicidade *in vitro* dos compostos sobre a linhagem celular BALB/c 3T3 e sobre o modelo experimental *in vivo*, *Caenorhabditis elegans*. Os isolados de *P. insidiosum* apresentaram CIMs na faixa de 0,625 a 10,000 µg/mL para mefenoxam e 0,019 a 5,000 µg/mL para pyraclostrobin. A COM variou de 1,250 a 20,000 µg/mL para mefenoxam e 0,039 a 10,000 µg/mL para pyraclostrobin. As imagens obtidas na MEV evidenciaram diferenças morfológicas entre as hifas controle e as hifas tratadas com os fitoantifúngicos, sugerindo a ocorrência de danos estruturais. Os testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* não demonstraram evidências de efeitos tóxicos nas dosagens avaliadas. Conclui-se que os compostos avaliados neste estudo demonstram potencial farmacológico de efetividade anti-*P.insidiosum*, necessitando novas avaliações, em especial de estudos *in vivo* e dentro de terapias multifarmacológicas.

Palavras-chave: Pitiose. Suscetibilidade. Oomiceto. Fitoantifúngicos.

ABSTRACT

ANTI-*Pythium insidiosum* ACTIVITY AND TOXICITY OF MEFENOXAM AND PYRACLOSTROBIN

AUTHOR: Paula Cristina Stibbe

ADVISOR: Sônia De Avila Botton

Pythiosis is an infection caused by the oomycete *Pythium insidiosum*. The disease affects different animal and human species, occurring in various regions of the world. Brazil stands out, with prevalence in animals and Thailand, with prevalence in humans. This infection usually becomes fatal, and does not exist a standard therapy to treat different species affected. The search for different treatment options has already demonstrated *in vitro* anti-*P.insidiosum* action of several pharmacological classes, especially antimicrobials. *In vivo* results, however, are conflicting and each species reacts differently to treatments. In the search for new therapeutic options, this study evaluated two phytoantifungal agents using the broth microdilution technique. Eighteen clinical isolates and three standard strains of *P. insidiosum* (n=21) were tested against the compounds mefenoxam and pyraclostrobin, in order to verify the susceptibility and define the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum oomicidal concentration (MOC) of all isolated. In addition, control hyphae of *P. insidiosum* and hyphae exposed to sublethal concentration of treatment with mefenoxam and pyraclostrobin were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) to verify possible structural and morphological differences. Additionally, *in vitro* toxicity of the compounds on the BALB/c 3T3 cell line and on *in vivo* experimental model, *Caenorhabditis elegans*, were evaluated. *P. insidiosum* isolates presented MICs in the range of 0.625 to 10,000 µg/mL for mefenoxam and 0.019 to 5,000 µg/mL for pyraclostrobin. MOC ranged from 1.250 to 20,000 µg/mL for mefenoxam and 0.039 to 10,000 µg/mL for pyraclostrobin. The images obtained by SEM showed morphological differences between the control hyphae and the hyphae treated with phytoantifungal agents, suggesting the occurrence of structural damage. *In vitro* and *in vivo* toxicity tests did not show evidence of toxic effects at the evaluated dosages for both compounds. Finally, the compounds evaluated in this research demonstrate pharmacological potential for effectiveness anti-*P.insidiosum*, requiring further evaluations *in vivo* and within multiparmacological therapies.

Keywords: Pythiosis. Susceptibility. Oomycete. Phytoantifungals.

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO

- Figura 1 - (Figura 1) Hifa de *Pythium insidiosum* (CBS 119455) visualizada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Hifas de *P. insidiosum* de aspecto túrgido apresentando superfície lisa, homogênea e regular (A, controle). Hifas de *P. insidiosum* tratadas com [0,312 µg / mL] mefenoxam (B) e [0,078 µg / mL] pyraclostrobin (C, D). As hifas tratadas com mefenoxam (B) apresentam superfície áspera e quebradiça. Nas hifas de *P. insidiosum* tratadas com piraclostrobin é evidente aspereza superficial, áreas com retração e perda de continuidade da parede celular (C) e pequenas granulações acumuladas na superfície das hifas (D). Magnitude: A e B x700; C x1000 e D x2000.....35
- Figura 2 - (Figura 2) Citotoxicidade de mefenoxam.....36
- Figura 3 - (Figura 3) Citotoxicidade de pyraclostrobin.....37
- Figura 4 - (Figura 4) Toxicidade de mefenoxam e pyraclostrobin frente ao modelo *in vivo* *C. elegans*..... 38

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1 - (Tabela 1) Suscetibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pythium insidiosum</i> (n=21) frente a mefenoxam e pyraclostrobin.....	27
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4 MANUSCRITO.....	22
5 CONCLUSÕES.....	39
6 REFERÊNCIAS.....	40

APRESENTAÇÃO

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

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

1 INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático, causador da pitiose, uma importante doença granulomatosa crônica que pode acometer humanos e animais, podendo ser fatal. Este microrganismo é prevalente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, se desenvolvendo em regiões alagadiças (MENDOZA et al., 1996).

O gênero *Pythium* abrange cerca de 150 espécies, grande parte habitante de vegetação e solo. A maioria dessas espécies apresenta alto potencial parasítico em plantas, podendo causar apodrecimento de raízes, caules e frutos. São exemplos as espécies *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, entre outros, que desencadeiam diversas infecções destrutivas ao desenvolvimento de uma grande variedade de plantas. Entretanto, a espécie *P. insidiosum* é capaz de infectar humanos e animais, desencadeando a enfermidade denominada pitiose (KIRK et al., 2008; GAASTRA et al., 2010).

Por muito tempo, *P. insidiosum* foi considerada a única espécie do gênero com capacidade patogênica em animais, incluindo o homem. Porém, essa individualidade passou a ser reavaliada após relatos de infecção em humanos com o isolamento da espécie *Pythium aphanidermatum*. Entretanto, é importante ressaltar que esse agente foi isolado junto a outros micro-organismos presentes nas lesões (CALVANO et al., 2011; FARMER et al., 2015).

A pitiose caracteriza-se geralmente pela presença de lesões granulomatosas em tecido cutâneo e subcutâneo e tende a apresentar evolução rápida. Não há predisposição por sexo, idade ou raça, e a forma de infecção ocorre por meio de zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e o homem (MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006; SANTOS et al., 2014).

Na espécie humana, a doença apresenta-se principalmente nas formas oftálmica, subcutânea e sistêmica, sendo as duas últimas associadas a α e β -talassemias, comuns no Sudeste da Ásia (IMWIDTHAYA, 1994). A Tailândia é o país com maior ocorrência de pitiose humana devido a diversos fatores, como o clima tropical úmido, a exposição durante o trabalho nas plantações de arroz sob irrigação e a alta incidência de α e β -talassemias na população (TRISCOTT et al., 1993).

No Brasil, os casos de pitiose são crescentes e descritos principalmente em equinos, especialmente na região do Pantanal Matogrossense (SANTOS et al., 2014). Contudo, há relatos da doença em diferentes estados do País e em diferentes espécies animais e no homem (MARQUES et al., 2006; SANTURIO et al., 2006; WEIBLEN et al., 2016).

Salienta-se que podem haver casos de pitiose não relatados ou até mesmo diagnosticados erroneamente, uma vez que o diagnóstico clínico apresenta limitações, pois podem ocorrer diferentes manifestações da doença e que se assemelham a outras enfermidades. No diagnóstico laboratorial também há dificuldades, pois, os métodos rotineiros são demorados e de baixa sensibilidade, todavia os métodos de maior especificidade são onerosos e requerem laboratórios especializados (GROOTERS, 2003; FARMER et al., 2015).

O diagnóstico precoce da pitiose está profundamente relacionado com o sucesso do tratamento e as chances de cura (GAASTRA et al., 2010), uma vez que a doença tem progressão rápida e necessita de tratamento diferenciado devido às características distintas de *P. insidiosum*. Este microrganismo possui a predominância de β -glucanos na sua parede celular, bem como a ausência de ergosterol que é alvo de uma gama de antifúngicos (MENDOZA et al., 1993; ALEXOPOULOS et al., 1996).

Não há atualmente uma terapia padrão para a pitiose. O tratamento baseia-se na combinação de terapias, que incluem tratamento químico, cirúrgico e imunoterapia. A resposta de cada abordagem terapêutica varia em cada caso e depende, na maioria das vezes, do hospedeiro, do tamanho e tempo de desenvolvimento da lesão (SANTURIO et al., 2006).

Apesar das características singulares do agente, há respostas relatadas para diferentes drogas, *in vitro* e *in vivo*, majoritariamente antifúngicos e antibacterianos, muitas vezes em combinação, porém com resultados conflitantes (MENDOZA et al., 2004; KRAJAEJUN et al., 2006; FONSECA et al., 2014). Sendo assim, tratamentos alternativos têm sido estudados, especialmente diferentes compostos farmacológicos (PIRES et al., 2014; THONGSRI et al., 2014; ARAUJO et al., 2016; POSRI et al., 2019; YOLANDA E KRAJAEJUN, 2020).

Neste sentido, esta pesquisa avalia a possibilidade de um redirecionamento de antifúngicos empregados para o controle de infecções causadas por oomicetos em culturas de plantas, a fim de verificar a suscetibilidade *in vitro* do oomiceto patógeno de mamíferos, *P. insidiosum*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-*P. insidiosum in vitro* e a toxicidade dos fitoantifúngicos mefenoxam e pyraclostrobin.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *P. insidiosum* aos compostos fitoantifúngicos mefenoxam e pyraclostrobin;
- Verificar a ocorrência de alterações morfológicas em hifas de *P. insidiosum* expostas à tratamento *in vitro* com mefenoxam e pyraclostrobin;
- Determinar a atividade toxicológica de mefenoxam e pyraclostrobin em modelos *in vitro* e *in vivo*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Pythium*, que engloba uma grande variedade de espécies, pertence à classe Oomycota, que apresenta como principais características a produção de zoósporos biflagelados e a parede celular composta de β -glucanos e celulose (KWON-CHUNG, 1994; DICK et al., 2001). Além disso, nos oomicetos há ausência de ergosterol na membrana celular, o que os tornam alvos difíceis para tratamentos com antifúngicos convencionais (ALEXOPOULOS et al., 1996; HENDRIX, 1964).

Os zoósporos são células nucleadas únicas que podem se movimentar com o auxílio de dois flagelos. Essas células representam a forma infectante de *P. insidiosum* e se encontram presentes nos ambientes aquáticos em que este microrganismo se desenvolve, podendo se encistar quando em contato com tecido dérmico de potenciais hospedeiros (humano ou animal), desenvolvendo assim, a infecção denominada pitiose (MENDOZA et al., 1993; MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 1998).

Pythium insidiosum não precisa de um hospedeiro suscetível para manter sua viabilidade e propagação, pois é capaz de sobreviver e se multiplicar em seu ambiente natural, utilizando plantas do meio aquático como substrato (MENDOZA et al., 1993; MILLER, 1983). Foi demonstrado previamente, que os zoósporos apresentam uma determinada quimiotaxia que auxilia na sua propagação e também secretam na sua superfície, após o encistamento, uma glicoproteína que permite a adesão ao tecido (MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 1998).

Além do ambiente aquático necessário para o desenvolvimento dos zoósporos, também a temperatura é um ponto importante, uma vez que as temperaturas entre 30 e 40°C são ótimas para o desenvolvimento destes propágulos infecciosos, demonstrando também que o microrganismo se adapta facilmente à temperatura corporal dos hospedeiros mamíferos (GAASTRA et al., 2010; MILLER & CAMPBELL, 1982; MENDOZA et al., 1996).

Uma vez encistados no tecido do hospedeiro, os zoósporos se infiltram nesse tecido e desenvolvem um tubo germinativo (hifa), que pode atingir os vasos sanguíneos e facilitar a disseminação da doença pelo organismo (IMWIDITHAYA, 1994; KRAJAEJUN et al., 2006; PUPAIBOOL et al., 2006). Em cada espécie, as manifestações clínicas da pitiose podem se apresentar de forma distinta, levando à dificuldade de um diagnóstico rápido e adequado (SANTURIO et al., 2006).

A infecção tem sido relatada em várias espécies animais, mas as espécies mais afetadas são a equina e a canina (MENDOZA et al., 1996). Em sua maioria, os equinos manifestam a doença na forma cutânea ou subcutânea, com desenvolvimento de tecido ulcerativo nodular arredondado e granulomatoso, contendo material necrótico chamado de *kunker*. Os *kunkers* aparecem especificamente na pitiose equina, sendo ausentes nas outras espécies (LEAL et al., 2001; GAASTRA et al., 2010; MENDOZA et al., 1996). Nos cães, a doença se manifesta principalmente na forma gastrointestinal, com sinais clínicos como vômitos, diarreia e massas palpáveis no abdômen (FISCHER et al., 1994).

No Brasil, o Pantanal Mato-Grossense é considerada a região de maior ocorrência da pitiose equina no mundo, acarretando em consideráveis perdas econômicas (SANTOS et al., 2014). Contudo, a pitiose é relatada em outras espécies animais e em diferentes regiões do País, como é o caso das regiões Sul (WEIBLEN et al., 2016), Sudeste (SANAVRIA et al., 2000) e Nordeste (TABOSA et al., 1999).

Pythium insidiosum foi relatado em gatos (GROOTERS, 2003; THOMAS E LEWIS, 1998), bovinos (PÉREZ et al., 2005; SANTURIO et al., 1998), ovinos (RIET-CORREA et al., 2008; SANTURIO et al., 2008; TABOSA et al., 2004) e aves (PESAVENTO et al., 2008; SOUTO et al., 2019). *P. insidiosum* foi isolado também de larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* na Índia (SCHURKO et al., 2003) e de larvas de mosquitos *Aedes aegypti* no Brasil (VILELA et al., 2018).

Não há evidências de que a pitiose possa se disseminar de forma zoonótica, nem pelo contato entre animais, contudo, a doença acomete também a espécie humana (THIANPRASIT, 1986; 1990). Geralmente o contato com os zoósporos de *P. insidiosum* ocorre em atividades relacionadas à agricultura ou lazer em locais com acúmulo de água doce (GAASTRA et al., 2010).

A talassemia aparece como um fator predisponente para a infecção nos humanos, e as manifestações clínicas da patologia se mostram distintas entre os casos relatados, variando entre as formas cutânea, vascular, oftálmica e sistêmica (KRAJAEJUN et al., 2006; GAASTRA et al., 2010).

A Tailândia, país onde a pitiose foi relatada pela primeira vez em humanos (THIANPRASIT, 1986), é a região com maior número de casos relatados no mundo, provavelmente devido a alguns fatores como a alta incidência de talassemia naquele país e o trabalho direto de grande parte da população com arroz irrigado, ambiente propício para o

desenvolvimento de *P. insidiosum*, além do clima tropical úmido (IMWIDTHAYA, 1994; TRISCOTT et al., 1993).

Outros casos de pitiose humana têm sido relatados na Austrália, Haiti, Malásia, Nova Zelândia e EUA (GAASTRA et al., 2010), mas acredita-se que no passado a doença possa ter sido diagnosticada erroneamente, confundindo-a com outras doenças granulomatosas e infecções fúngicas (MENDOZA et al., 2003). No Brasil, apenas um caso de pitiose humana foi relatado até o presente momento (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006).

A fisiopatologia da doença ainda não está totalmente elucidada. Mesmo sabendo-se que a pitiose desencadeia uma resposta imune humoral no hospedeiro, essa imunidade não é capaz de combater a infecção (MILLER E CAMPBELL, 1983; TRISCOTT et al., 1993). Dessa forma, há um grande número de variáveis que dificultam tanto o diagnóstico quanto o tratamento da doença, demonstrando a importância da pesquisa de novas alternativas terapêuticas (YOLANDA E KRAJAEJUN, 2020).

A precocidade do diagnóstico é um ponto crucial para a cura da doença, pois determina o início de tratamento rápido e adequado, evitando os desfechos fatais ocasionados por esta infecção. O diagnóstico da pitiose pode ser realizado através de exame histopatológico e isolamento do agente, imunohistoquímica, imunodifusão, sorologia através de técnicas imunoenzimáticas (enzyme linked immunosorbent assay - ELISA), reação da cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento gênico (BOTTON et al., 2011; BROWN et al., 2008; KAUFMAN et al., 1990; MENDOZA et al., 1997; MILLER & CAMPBELL 1982; SANTURIO et al., 2006).

Em relação ao tratamento da pitiose, ainda não há uma terapia padrão. O manejo clínico da doença geralmente envolve uma combinação de terapias, incluindo manejo cirúrgico, quimioterapia e imunoterapia (SANTURIO et al, 2006). A excisão completa do tecido infectado ainda aparece como uma das principais escolhas para o sucesso do tratamento (REANPANG et al., 2015), porém algumas formas clínicas da doença parecem responder melhor ao tratamento com quimioterápicos, como a pitiose ocular (MAENO et al., 2019; RAMAPPA et al., 2017; ROS CASTELLAR et al., 2017).

Apesar da ausência de ergosterol, *P. insidiosum* têm demonstrado resposta a alguns antimicrobianos, incluindo os antifúngicos (BROWN et al., 2008; CAVALHEIRO et al., 2009; GROOTERS, 2003; JESUS et al., 2014; LORETO et al., 2018; PEREIRA et al., 2007; SHENEP et al., 1998; TRISCOTT et al., 1993).

A pesquisa por novos compostos farmacológicos como alternativa para a terapêutica da pitiose inicia-se geralmente por meio de testes *in vitro*, que são essenciais para a triagem inicial da resposta farmacológica e a sua aplicabilidade é verificada por meio de testes de suscetibilidade. Variados métodos de suscetibilidade *in vitro* têm sido empregados nas pesquisas envolvendo *P. insidiosum*, como o método de microdiluição em caldo, o método de crescimento radial e o método de difusão em ágar (YOLANDA E KRAJAEJUN, 2020).

O método da microdiluição em caldo envolve o uso de uma suspensão de hifas ou de zoósporos de *P. insidiosum*. Os zoósporos são produzidos laboratorialmente por meio de fragmentos de grama (*Paspalum notatum*) esterilizados e parasitados com hifas de *P. insidiosum*. Após, são coletados, contabilizados em câmara de Neubauer e padronizados para a concentração de $2 \text{ a } 3 \times 10^3 / \text{mL}$ que irá compor o inóculo utilizado nos testes de suscetibilidade (MENDOZA E PRENDAS, 1988; PEREIRA et al., 2007). Já a suspensão de hifas é preparada através do cultivo de *P. insidiosum* em meio de cultura líquido (tradicionalmente ágar de extrato de levedura 0,1%), onde as hifas crescidas são diluídas em água estéril e padronizadas para alcançar 80 a 85% de transmitância no comprimento de onda de 530 nm. Essa suspensão é então utilizada como inóculo para os testes de suscetibilidade (FONSECA et al., 2014; VALENTE et al., 2016).

Os testes de suscetibilidade *in vitro* baseados na metodologia de microdiluição em caldo tem como base os padrões estabelecidos pelo protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com modificações propostas por Pereira et al. (2007). Através do inóculo de *P. insidiosum*, são preparadas placas de 96 poços utilizando a diluição seriada para avaliar diferentes concentrações da droga/composto e utilizando o RPMI-1640 como diluente. Assim, é determinada a concentração inibitória mínima (CIM) ou a concentração cidal mínima (CCM) de cada droga para os isolados testados (YOLANDA E KRAJAEJUN, 2020).

Para a realização do método de crescimento radial, são utilizados fragmentos de ágar contendo hifas de *P. insidiosum* que são depositados sobre uma nova placa de ágar, contendo diferentes concentrações da droga/composto. Após a incubação, avalia-se o crescimento das hifas e realiza-se a leitura do diâmetro em relação a cada concentração da droga. O diâmetro médio da colônia de cada cepa é subtraído pela largura do tampão de ágar (~ 5 mm) e dividido por dois para obter o crescimento radial de *P. insidiosum*. A CIM é determinada pela concentração da droga que inibir totalmente o crescimento das hifas (BROWN et al., 2008; KRAJAEJUN et al., 2012).

No método de difusão em ágar, também há a possibilidade de usar uma suspensão de zoósporos ou fragmentos de ágar com crescimento hifal de *P. insidiosum*, com o objetivo de inocular a placa. Para a realização do teste, é necessário pipetar a suspensão de zoósporos (3 a 5×10^4 / mL) na placa de ágar ou transpor o fragmento do ágar (1 x 1 cm) com crescimento hifal para o centro da nova placa. Posteriormente, são adicionados discos de difusão embebidos com a droga/composto a ser analisado e, após incubação, é realizada a medida do crescimento hifal em relação ao disco para a determinação da CIM. Nessa metodologia também pode ser usado o *E-test* comercial (bioMérieux, França) ou o *MIC Test Strip* (Liofilchem, Itália), substituindo o disco, e a CIM deve então ser lido na escala fornecida (SRIPHANA et al., 2013; LORETO et al., 2014; LORETO et al., 2018).

Em relação as opções farmacológicas que vem sendo estudadas frente a *P. insidiosum*, além de antimicrobianos empregados na clínica para outras infecções e a imunoterapia, alguns compostos alternativos têm sido testados, como alguns produtos naturais (ARAUJO et al., 2016; FONSECA et al., 2015; POSRI et al., 2019; SRIPHANA et al., 2013a; SRIPHANA et al., 2013b; VALENTE et al., 2016; ZANETTE et al., 2011), terapia fotodinâmica (PIRES et al., 2014), compostos metálicos (VALENTE et al., 2019) e metabólitos de alguns microrganismos (THONGSRI et al., 2014; WITTAYAPIPATH et al., 2019).

Brown et al. (2008) relataram a ação do antifúngico agrícola mefenoxam, que demonstrou atividade inibitória *in vitro* sobre isolados de *P. insidiosum*. Neste estudo foi utilizado o método de crescimento radial e a concentração de 1 µg / mL demonstrou > 90% de inibição para os isolados testados. Posteriormente, este antifúngico foi usado experimentalmente no tratamento de um caso de pitiose gastrointestinal canina. O cão esteve em tratamento durante 20 meses, dos quais 18 meses tiveram o mefenoxam incluso na terapia, juntamente à terbinafina e itraconazol, resultando na resolução da infecção. O mefenoxam foi administrado na dose de 4 mg/kg duas vezes ao dia e foi bem tolerado pelo cão, não apresentando anormalidades clínicas, hematológicas ou bioquímicas (HUMMEL et al., 2011).

Mais recentemente, Cridge et al. (2020) relataram o uso experimental de mefenoxam concomitantemente à outras drogas, no tratamento de pitiose em seis cães (cinco com pitiose gastrointestinal e um com pitiose cutânea). White et al. (2020) apresentaram resultado de sucesso do uso de mefenoxam, em terapia multifarmacológica frente a paragenidiose cutânea em um cão, doença causada pelo microrganismo *Paralagenidium* sp. pertencente à classe Oomycota. Mefenoxam é um fungicida agrícola, pertencente aos acilalaninatos e é empregado

em culturas vegetais suscetíveis a fungos e oomicetos. O composto atua impedindo a síntese de ácido ribonucleico (RNA) via inibição da RNA polimerase (GISI E SIEROTZKI, 2008).

Os antifúngicos da classe das estrobilurinas, com atividade antibiótica e antifúngica, apresentam compostos quimicamente semelhantes à pirrolnitrina, um metabólito secundário produzido por algumas bactérias do triptofano, como *Pseudomonas stutzeri* (FLOSS et al., 1971). Esse metabólito apresenta atividade inibitória frente a alguns microrganismos, como previamente relatado para *P. insidiosum* (THONGSRI et al., 2014). Pyraclostrobin é um representante da classe das estrobilurinas, utilizado no controle de fungos ascomicetos e basidiomicetos fitopatogênicos (BARTLETT et al., 2002).

4 MANUSCRITO

Mefenoxam e pyraclostrobin: toxicidade e atividade inibitória *in vitro* frente a *Pythium insidiosum*

(O manuscrito será submetido ao periódico **Clinical Microbiology and Infection**)

Paula Cristina Stibbe^{1, a,2}, Lara Baccarin Ianiski^{1, a,2}, Carla Weiblen³, Pauline Christ Ledur^{1, 2}, Marina Lopes Machado^{1, b}, Tássia Limana da Silveira^{1, b}, Janio Morais Santurio^{1, 2}, Mauro Pereira Soares⁴, Daniela Isabel Brayer Pereira⁵, Luís Antonio Sangioni^{1, c,6}, Sônia de Avila Botton^{1, c, 6*}

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Santa Maria, RS, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Santa Maria, RS, Brasil.

²Laboratório de Pesquisas Micológicas, Santa Maria, RS, Brasil.

³Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santiago, RS, Brasil.

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Pelotas, RS, Brasil.

⁵Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Pelotas, RS, Brasil.

⁶UFSM, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Santa Maria, RS, Brasil.

*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, Brasil. Tel./fax: +55 55 3220-9390. E-mail: sabott20@gmail.com

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi verificar a suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* aos fungicidas agrícolas mefenoxam e pyraclostrobin, bem como avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* para ambos os compostos. **Métodos:** Foram testados 21 isolados de *P. insidiosum* frente a mefenoxam e pyraclostrobin, pelo método de microdiluição em caldo. Foram estabelecidas as concentrações inibitórias mínimas e oomicidas para ambos os compostos. Adicionalmente, foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) nas hifas de *P. insidiosum* tratadas com a concentração subletal de cada fungicida. A toxicidade dos compostos foi avaliada em linhagem celular de fibroblastos de camundongos (BALB/c 3T3) e no modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*. **Resultados:** A concentração para inibir 100% do crescimento de *P. insidiosum* variou de 0,625 a 10 µg/mL para mefenoxam e de 0,019 a 5 µg/mL para pyraclostrobin. Na MEV foi possível observar alterações na superfície das hifas tratadas com os fungicidas, sugerindo possíveis danos causados pelos compostos. Não houve evidências de toxicidade nos modelos utilizados *in vitro* e *in vivo*. **Conclusão:** Mefenoxam e pyraclostrobin não apresentaram toxicidade nas doses avaliadas e possuem atividade inibitória sobre o oomiceto patogênico *P. insidiosum*. Contudo, maiores avaliações sobre a farmacocinética e toxicidade dos mesmos em diferentes espécies animais e possíveis interações farmacológicas são necessárias para inferir um possível uso no manejo clínico da pitiose.

Introdução

Pythium insidiosum é o oomiceto causador da pitiose. Esta doença é diagnosticada em vários países do mundo e pode afetar diversas espécies animais, em especial os mamíferos, incluindo o homem [1]. Este microrganismo prolifera em água doce, onde libera a sua forma infectante, o zoósporo, capaz de desencadear a infecção no hospedeiro. A enfermidade é de difícil diagnóstico e tratamento, sendo geralmente necessária uma combinação de terapias farmacológicas, imunoterápicas e cirúrgicas [1, 2].

Sendo assim, a busca por diferentes alternativas de tratamento para a doença vem sendo pesquisada e diversos estudos *in vitro* demonstraram a ação de várias classes medicamentosas frente a *P. insidiosum*, dentre eles, os antibacterianos [3-7] e antifúngicos [4, 8-10]. Outros compostos distintos também demonstraram bons resultados, como é o caso do mefenoxam, fungicida vegetal normalmente empregado em tratamentos agrícolas [11].

Mefenoxam pertence aos acilalaninatos e tem ação sobre fitopatógenos como fungos e oomicetos [12]. A atividade *in vitro* de mefenoxam frente a *P. insidiosum* foi relatada no estudo de Brown et al. (2008) e, posteriormente, foi utilizado em terapias associadas no tratamento de pitiose gastrointestinal canina [13, 14]. Recentemente, Cridge et al. (2020) relataram o uso de mefenoxam concomitantemente a outros protocolos terapêuticos, no tratamento de pitiose em seis cães, sendo cinco com pitiose gastrointestinal e um com pitiose cutânea [15]. Adicionalmente, White et al. (2020) utilizaram mefenoxam associado a outras terapias, para tratamento de paralagenidiose cutânea em um cão, causada por *Paralagenidium* sp. [16].

Alguns metabólitos secundários isolados de fontes naturais, como plantas e microrganismos, originaram o grupo das estrobilurinas, que são empregados como fungicidas agrícolas de amplo espectro de atividade, a exemplo do pyraclostrobin, utilizado no controle de fungos ascomicetos e basidiomicetos fitopatogênicos [17]. Thongsri et al. (2014) relataram a ação anti-*P. insidiosum* da pirrolnitrina, um metabólito secundário obtido de *Pseudomonas stutzeri* [18].

O objetivo deste estudo foi verificar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* aos fungicidas agrícolas mefenoxam e pyraclostrobin, bem como avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* para ambos os compostos.

Métodos

Isolados de *Pythium insidiosum*

Para os testes de suscetibilidade foram utilizados 21 isolados de *P. insidiosum*, sendo 18 isolados clínicos brasileiros (17 de origem equina e 1 de origem canina, registro no SISGEN A07F9A9) e 3 cepas padrão (CBS 119455, CBS 57585 e CBS 77784). Todos os isolados foram previamente identificados molecularmente conforme Weiblen et al. [19].

Fungicidas agrícolas

Mefenoxam (Metalaxyl[®], Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) e pyraclostrobin (Pyraclostrobin[®], Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) foram obtidos comercialmente. As soluções estoque foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA). Para a realização dos testes foram preparadas soluções de trabalho diluídas em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) com ajustes para pH 7,0, utilizando o tampão ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Inlab, Diadema, SP, Brasil). As

concentrações de trabalho variaram de 0,039 a 20 µg/mL para mefenoxam e 0,019 a 10 µg/mL para pyraclostrobin.

Preparação do inóculo e testes de suscetibilidade *in vitro*

O inóculo empregou zoósporos de *P. insidiosum* produzidos pelo método *in vitro* de zoosporogênese, descrito por Pereira et al. com modificações de Ianiski et al. [4, 10].

Os testes de suscetibilidade seguiram a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) [20]. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas pela visualização de crescimento ou inibição de crescimento micelial após incubação a 37°C/24h, em comparação com o controle positivo (crescimento micelial do inóculo em RPMI sem os antifúngicos) e negativo (somente RPMI).

Na leitura da placa foram determinadas as CIM₀ (100% de inibição do crescimento), CIM₁ (≥90% e <100% de inibição do crescimento) e CIM₂ (inibição do crescimento ≥50% e <90%) de mefenoxam e pyraclostrobin para todos os isolados. Adicionalmente, determinou-se a concentração oomicida mínima (COM), baseada nas CIM₀ de cada isolado. A determinação da COM foi realizada em tubos contendo caldo Sabouraud Dextrose (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) incubados a 37°C/24h. A interpretação da COM considerou se houve ou não crescimento micelial de cada composto para cada isolado.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi realizada seguindo o protocolo descrito por Valente et al. [21]. Hifas de *P. insidiosum* (CBS 119455) tratadas com mefenoxam e pyraclostrobin, na dose subletal de 0,312 µg/mL e 0,078 µg/mL, respectivamente, e hifas controle (sem tratamento) foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) a 4°C/48h. Após lavagem com água destilada estéril, as hifas foram submetidas a banhos com concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 95, 100%) (20µL/50s). Em seguida, as hifas foram submetidas ao processo de secagem em estufa a 37°C/24h. Após, as amostras foram banhadas com ouro metálico e visualizadas a 5 kV em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, modelo JSM 6360).

Avaliação da toxicidade *in vitro*

A linhagem celular de fibroblastos de camundongos (BALB/c 3T3) foi cultivada em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO™) e incubada a 37°C/24h, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células viáveis foram verificadas e padronizadas (3 x 10⁴ células/poço). Após aderência celular nas placas, foi descartado o sobrenadante e adicionado os compostos nas diferentes concentrações (de 1, 5, 15, 30 e 50 µg/mL) e avaliadas em triplicata, juntamente com o controle positivo (apenas a linhagem celular) e controle negativo (DMSO). Após exposição por 24h e 72h, foi adicionado o corante MTT (brometo 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazólio) e realizada a leitura em leitor de placa de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), na faixa de leitura de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular, comparando-as com os grupos controle [22, 23].

Avaliação da toxicidade *in vivo*

A linhagem N2 de *Caenorhabditis elegans* do tipo selvagem (WT) (var. Bristol) foi adquirida no Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, EUA) e foi mantida a 20°C em placas de meio de crescimento de nematóides (NGM) contendo *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento. Para a realização dos experimentos, utilizou-se o primeiro estágio larval (L1), obtido pelo isolamento de embriões de hermafroditas grávidas com solução clarificante (NaOCl 1%, NaOH 0,25 M). Os ovos foram mantidos em tampão M9 (Na₂HPO₄ 42 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 8,6 mM e MgSO₄ 1 mM) durante a noite para eclodir e obter o estágio L1 [24].

Para investigar os potenciais efeitos toxicológicos de mefenoxam e de pyraclostrobin, seguimos um protocolo previamente descrito com algumas modificações [25, 26]. Cerca de 500 larvas em estágio L1 de *C. elegans* foram transferidos para microtubos contendo diferentes concentrações de mefenoxam e pyraclostrobin em tampão M9. O estágio L1 foi escolhido devido a sua maior sensibilidade a tóxicos [27, 28]. As concentrações de tratamento foram 5, 20 e 50 µg / mL de ambos fungicidas e DMSO a 0,004% foi usado como controle. Após 1 h, as larvas foram lavadas pelo menos três vezes com tampão M9 para remover o tratamento e deixadas em recuperação por 1 hora em tampão M9. Aproximadamente 100 larvas por grupo foram classificadas como mortas ou vivas usando um estereomicroscópio. As larvas que

reagiram a um estímulo mecânico com um fio de platina foram classificadas como vivas e as larvas que não responderam foram consideradas mortas. As análises foram realizadas em três ensaios independentes.

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). A estatística entre os grupos foi determinada por uma ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunnett. Os valores são representados como média \pm erro padrão da média (EPM), os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Os resultados encontrados nos testes de suscetibilidade *in vitro* estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Pythium insidiosum* (n=21) frente mefenoxam e pyraclostrobin.

Concentrações inibitórias e oomicidas ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Composto	
	Mefenoxam	Pyraclostrobin
CIM ₀ (MG)	0,625 - 10,000 (2,76)	0,019 - 5,000 (0,35)
CIM ₁ (MG)	0,312 - 5,000 (1,38)	0,019 - 2,500 (0,20)
CIM ₂ (MG)	0,156 - 2,500 (0,69)	0,019 - 1,250 (0,18)
COM (MG)	1,250 - 20,000 (6,30)	0,039 - 10,000 (0,81)

CIM 0: 100% de inibição do crescimento; CIM 1: $\geq 90\%$ e $< 100\%$ de inibição do crescimento; CIM 2: inibição do crescimento $\geq 50\%$ e $< 90\%$; COM: concentração oomicida mínima; MG: média geométrica.

As imagens obtidas na MEV estão apresentadas na figura 1. Observa-se que as hifas controle, não tratadas (1A) apresentaram aspecto túrgido, com superfície lisa e homogênea. Na figura 1B, hifas tratadas com mefenoxam evidenciaram aspecto rugoso, retraído e quebradiço. Nas hifas tratadas com pyraclostrobin, fica evidente a rugosidade superficial, apresentando áreas com retração e perda de continuidade da parede celular (1C) e pequenas granulações acumuladas na superfície das hifas (1D).

Em relação a análise de toxicidade *in vitro*, os resultados da avaliação de mefenoxam estão representados na figura 2. Observou-se que em 24h e 72h de exposição celular ao composto, a

viabilidade celular da linhagem avaliada não reduziu significativamente nas doses abaixo de 50 µg/mL. Na figura 3 estão apresentados os resultados da avaliação de toxicidade celular para o pyraclostrobin. Verificou-se uma variação nos resultados de viabilidade celular, havendo diminuição da viabilidade nas células expostas por 72h.

Nos testes de toxicidade *in vivo*, observou-se que mefenoxam e pyraclostrobin não induziram mortalidade em larvas L1 de *C. elegans*, nas concentrações testadas (Figura 4).

Discussão

Os fungicidas avaliados inibiram o crescimento *in vitro* dos isolados de *P. insidiosum*, bem como não apresentaram efeitos de toxicidade nos modelos avaliados. Desta forma, os resultados deste estudo indicam que ambos compostos pesquisados apresentam potencial para futuros estudos a fim de compor um arsenal terapêutico para a pitiose clínica.

No presente estudo, mefenoxam foi capaz de inibir o crescimento micelial de *P. insidiosum*, em concentrações de 0,625 a 10,000 µg/mL. Previamente, Brown et al. [13] ao avaliarem a suscetibilidade de *P. insidiosum* (n=6) ao mefenoxam, empregando o método de difusão em disco, demonstraram que a concentração de 1 µg/mL inibiu > 90% dos isolados avaliados. A maior amplitude nas variações das CIM obtidas em nosso estudo para o mefenoxam pode ser justificada devido ao maior número de isolados de *P. insidiosum* avaliados, bem como pela técnica empregada de microdiluição. Todavia, nossos resultados aliados ao de Brown et al. [13] evidenciaram que este composto possui atividade inibitória *in vitro* frente a este oomiceto.

Adicionalmente, o uso de mefenoxam foi relatado no tratamento da pitiose canina em combinação com outros protocolos terapêuticos, incluindo antimicrobianos, anti-inflamatórios e procedimentos cirúrgicos [14, 15]. Contudo, como estes relatos combinaram o mefenoxam nas diferentes terapias, torna-se difícil inferir sobre o real papel terapêutico desse composto nestes tratamentos.

Pyraclostrobin nunca havia sido relatado em estudos frente ao oomiceto *P. insidiosum*. Sendo assim, este estudo demonstrou os primeiros resultados em relação à atividade desse composto frente a este importante patógeno de impacto na medicina humana e veterinária. Os valores de CIM₀ para os isolados testados variaram de 0,019 a 5,000 µg/mL, demonstrando que há uma ação de inibição abaixo das doses de referência consideradas tóxicas para este composto (Dose de Referência Aguda 0,7 mg/kg) [29].

As imagens obtidas na MEV, tanto para mefenoxam quanto para pyraclostrobin, sugerem que as hifas tratadas apresentaram danos decorrentes da ação dos compostos, em comparação com as hifas controle. Previamente, Valente et al. [4] e Ianiski et al. [21], ao avaliarem hifas de *P. insidiosum* expostas a diferentes compostos através da MEV, também observaram o aspecto rugoso, retraído e quebradiço das hifas tratadas [4, 21]. Além destas características em comum com os trabalhos anteriores, as imagens obtidas das hifas tratadas com pyraclostrobin evidenciam a deposição de grânulos na superfície, o que também foi observado anteriormente no estudo de Trolezi et al. [30], que avaliou a ação *in vitro* e *in vivo* do extrato de casca crua de *Stryphnodendron adstringens* e tanino purificado sobre *Pythium insidiosum*. Nos estudos de Valente et al. [4] e Ianiski et al. [21] foi realizada além da MEV, a microscopia eletrônica de transmitância (MET), na qual puderam visualizar alterações nas estruturas internas da hifa. No presente estudo, não foi possível realizar a MET para avaliar a ocorrência de alterações intracelulares. Consideramos que esta foi uma limitação do nosso estudo, justificada devido as restrições impostas pela pandemia COVID-19 que impediu a realização desta análise.

Em relação a avaliação de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, não foram verificados efeitos tóxicos nas doses testadas, para ambos os compostos. Encontramos na literatura alguns relatos de toxicidade celular *in vitro*, como o estudo de Luz et al. [31], que apontam para possíveis efeitos tóxicos do pyraclostrobin, porém reforçamos a importância da realização de novas pesquisas, utilizando uma margem de doses mais ampla e uma variedade maior de linhagens celulares e metodologias, a fim de avaliar de forma mais completa os possíveis efeitos citotóxicos desses fungicidas.

A avaliação da toxicidade *in vivo* destes compostos foi previamente estabelecida na literatura, para a liberação comercial de ambos fungicidas agrícolas [29]. No entanto, é de grande importância avaliar a toxicidade em diferentes sistemas alternativos *in vivo* frente a hipótese de uma nova aplicabilidade desses compostos, com a possibilidade de serem utilizados em futuros ensaios terapêuticos e em diferentes espécies animais.

Os fungicidas avaliados neste estudo, que são normalmente utilizados no manejo de espécies fitopatogênicas de *Pythium* spp., demonstraram ser eficazes frente aos isolados de *P. insidiosum*, oomiceto patogênico para mamíferos. Interessantemente, sua ação se deu em doses que não apresentaram toxicidade nos modelos avaliados, demonstrando potencial de serem utilizados no manejo terapêutico da pitiose. Contudo, são necessárias novas pesquisas, com a

finalidade de avaliar o uso clínico desses compostos e verificar as possíveis interações em tratamentos multifarmacológicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Natália de Freitas Daudt e Félix Alexandre Antunes Soares da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Adicionalmente, nós agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Recursos financeiros

Este trabalho teve apoio das agências brasileiras: CNPq [número 420538/2018-6, Projeto Universal, 02/2018]; FAPERGS [número 17/2551-0000951-7, Programa Pesquisador Gaúcho – PqG, 02/2017]; e CAPES [código 001].

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesse relacionado ao estudo.

Contribuições dos autores

Execução: PCS; Escrita – revisão e edição: PCS, SAB, LAS, DIBP, JMS; Análises microbiológicas: PCS, LBI, CW; Análises de microscopia: MPS; Análises toxicológicas: PCS, PCL, MLM, TLS.

Referências

- [1] W. Gaastra, L.J. A. Lipman, A.W.M. De Cock, T.K. Exel, R.B.G. Pegge, J. Scheurwater, R. Vilela, L. Mendoza. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol.* (2010) 146: 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.019>
- [2] J.M. Santurio, S.H. Alves, D.B. Pereira, J.S. Argenta. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Sci. Vet.* (2006) 34: 1-14. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.15060>
- [3] S.R. Itaquí, C.M. Verdi, J.S. Tondolo, T.S. Da Luz, S. H. Alves, J.M. Santurio, E. S. Loreto. *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>
- [4] L.B. Ianiski, P.C. Stibbe, L.B. Denardi, C. Weiblen, M.P. Soares, J.S.S. Valente, L.A. Sangioni, D.I.B. Pereira, J.M. Santurio, S.A. Botton. In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination. Med Mycol. (2021) 59: 67-73. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa032>
- [5] F.P. Jesus, L. Ferreira, E.S. Loreto, M.B. Pilotto, A. Ludwig, K. Bizzi, J.S. Tondolo, R.A. Zanette, S.H. Alves, J.M. Santurio. *In Vitro* and *In Vivo* Antimicrobial Activities of Minocycline in Combination with Azithromycin, Clarithromycin, or Tigecycline against *Pythium insidiosum*. Antimicrob Agents Chemother. (2014) 58: 5621 - 5625.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01480-15>
- [6] E.S. Loreto, D.A.N. Mario, L.B. Denardi, S.H. Alves, J.M. Santurio. *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>
- [7] E.S. Loreto, J.S. Tondolo, D.C. Oliveira, J.M. Santurio, S.H. Alves. *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. <https://doi.org/10.1128/AAC.01678-17>
- [8] J.S. Argenta, J.M. Santurio, S.H. Alves, D.I.B. Pereira, A.S. Cavalheiro, A. Spanamberg, L. Ferreira. In Vitro Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Terbinafine Alone or in Combination against *Pythium insidiosum* Isolates from Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. (2008) 52: 767 - 769. <https://doi.org/10.1128/AAC.01075-07>
- [9] A.S. Cavalheiro, G. Maboni, M.I. Azevedo, J.S. Argenta, D.I. Pereira, T.B. Spader, S.H. Alves, J.M. Santurio. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. Antimicrob. Agents Chemother. (2009) 53:2136 - 2138.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01506-08>
- [10] D.I.B. Pereira, J.M. Santurio, S. H. Alves, J.S. Argenta, L. Potter, A. Spanamberg, L. Ferreira L Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. J Antimicrob Chemother. (2007) 60 : 1168 - 1171.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkm332>

- [11] H. Yolanda, T. Krajaejun. Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against *Pythium insidiosum*. *Heliyon* (2020) 6:4.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03737>
- [12] U. Gisi, H. Sierotzki. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur. J. Plant Pathol.* (2008) 122: 157-167. doi: 10.1007/978-1-4020-8973-2_12
- [13] T.A. Brown, A.M. Grooters, G.L. Hosgood. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. *Amer. J. Vet. Res.* (2008) 69: 1463 - 1468.
<https://doi.org/10.2460/ajvr.69.11.1463>
- [14] J. Hummel, A. Grooters, G. Davidson, S. Jennings, J. Nicklas, A. Birkenheuer. Successful management of gastrointestinal pythiosis in a dog using itraconazole, terbinafine, and mefenoxam. *Med. Mycol.* (2011) 49: 539 - 542.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2010.543705>
- [15] H. Cridge, S.M. Hughes, V.C. Langston, A.J. Mackin. Mefenoxam, Itraconazole, and Terbinafine Combination Therapy for Management of Pythiosis in Dogs (Six Cases). *J Am Anim Hosp Assoc* (2020) 56: 307. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7039>
- [16] A.G. White, K. Smart, T. Hathcock, D. M. Tillson, A. Poudel, P. Rynders, C. Wang. Successful management of cutaneous paralagenidiosis in a dog treated with mefenoxam, minocycline, prednisone, and hyperbaric oxygen therapy. *Med. Mycol. Case Reports* (2020) 29:38-42. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2020.07.003>
- [17] D.W. Bartlett, J.M. Clough, J.R. Godwin, A.A. Hall, M. Hamer, B. Parr-Dobrzanski. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* (2002) 58: 649-662 <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- [18] Y. Thongsri, C. Aromdee, C. Yenjai, S. Kanokmedhakul, A. Chaiprasert, P. Hamal, C. Prariyachatigul. Detection of diketopiperazine and pyrrolnitrin, compounds with anti-*Pythium insidiosum* activity, in a *Pseudomonas stutzeri* environmental strain. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* (2014) 158: 378-383
<http://biomed.papers.upol.cz/pdfs/bio/2014/03/08.pdf>
- [19] C. Weiblen, M.I. Azevedo, L.B. Ianiski, P.C. Stibbe, D.I.B. Pereira, R.A. Zanette, L.A. Sangioni, R. Rivero, J.M. Santurio, S.A. Botton. Genotyping of South American clinical isolates of *Pythium insidiosum* based on single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR. *Cienc Rural.* (2019) 49. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180744>

- [20] Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi—2nd Edition: Approved Standard M38-A2. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.
- [21] J.S.S. Valente, C.Q. Braga, C.L. Brasil, C.T. Baptista, G.F. Reis, L.A. Panagio, G. Nakazato, S.O. Hubner, M.P. Soares, S.A. Botton, D.I.B. Pereira. In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. *Med Mycol.* (2019) 57: 858–863. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy147>
- [22] D. Jesus, J.R. Oliveira, F.E. Oliveira, K.C. Higa, J.C. Junqueira, A.O.C. Jorge, G.N. Back-Brito, L.D. Oliveira. *Persea americana* Glycolic Extract: In Vitro Study of Antimicrobial Activity against *Candida albicans* Biofilm and Cytotoxicity Evaluation. *The Sci. World J.* (2015) 2015: 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/531972>
- [23] S.O. Rogero, A.B. Lugão, T.I. Ikeda, A.S. Cruz. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Res.* (2003) 6: 317-320. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300003>
- [24] S. Brenner. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* (1974) 77: 71-94. PMC1213120
- [25] Q. Wu, A. Nouara, Y. Li, M. Zhang, W. Wang, M. Tang, B. Ye, J. Ding, D. Wang. Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* (2013) 90(3): 1123-1131. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.019>
- [26] C.P. Frizzo, C. R. Bender, P. R. S. Salbego, C. A. A. Farias, T. C. da Silva, S. T. Stefanello, T. L. da Silveira, F. A. A. Soares, M. A. Villetti, M. A. P. Martins. Impact of Anions on the Partition Constant, Self-Diffusion, Thermal Stability, and Toxicity of Dicationic Ionic Liquids. *ACS Omega* (2018) 3: 734-743. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01873>
- [27] K. W. Chu, S. K. Chan, K. L. Chow. Improvement of heavy metal stress and toxicity assays by coupling a transgenic reporter in a mutant nematode strain. *Aquat Toxicol.* (2005) 74(4): 320-332. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.006>
- [28] X. Xing, Q. Rui, D. Wang. Lethality toxicities induced by metal exposure during development in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2009) 83(4): 530-536. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9816-3>
- [29] The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, 2018.

- [30] R. Trolezi, J.M. Azanha, N.R. Paschoal, J.L. Chechi, M.J.D. Silva, V.E. Fabris, W. Vilegas, R. Kaneno, A.F. Junior, S.M.G. Bosco. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* (2017) 16: 7. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0183-3>
- [31] A.L. Luz, C.D. Kassotis, H.M. Stapleton, J.N. Meyer. The high-production volume fungicide pyraclostrobin induces triglyceride accumulation associated with mitochondrial dysfunction, and promotes adipocyte differentiation independent of PPAR γ activation, in 3T3-L1 cells. *Toxicology* (2018) 393: 150-159. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.11.010>

Figura 1. Hifa de *Pythium insidiosum* (CBS 119455) visualizada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Hifas de *P. insidiosum* de aspecto túrgido apresentando superfície lisa, homogênea e regular (A, controle). Hifas de *P. insidiosum* tratadas com [0,312 µg / mL] mefenoxam (B) e [0,078 µg / mL] piraclostrobin (C, D). As hifas tratadas com mefenoxam (B) apresentam superfície áspera e quebradiça. Nas hifas de *P. insidiosum* tratadas com piraclostrobin é evidente aspereza superficial, áreas com retração e perda de continuidade da parede celular (C) e pequenas granulações acumuladas na superfície das hifas (D). Magnitude: A e B x700; C x1000 e D x2000.

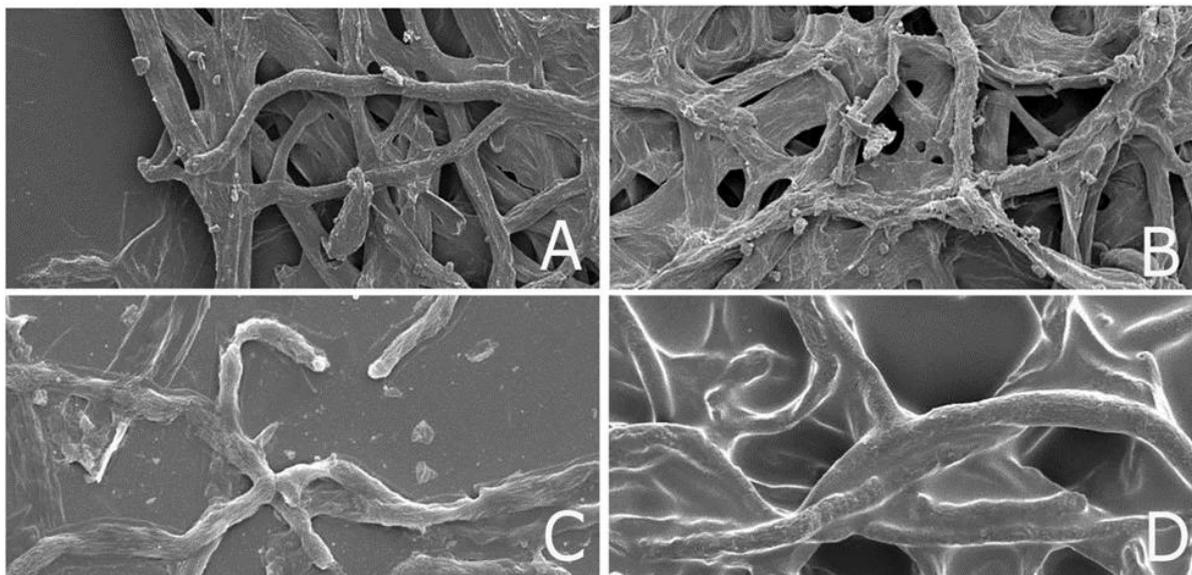
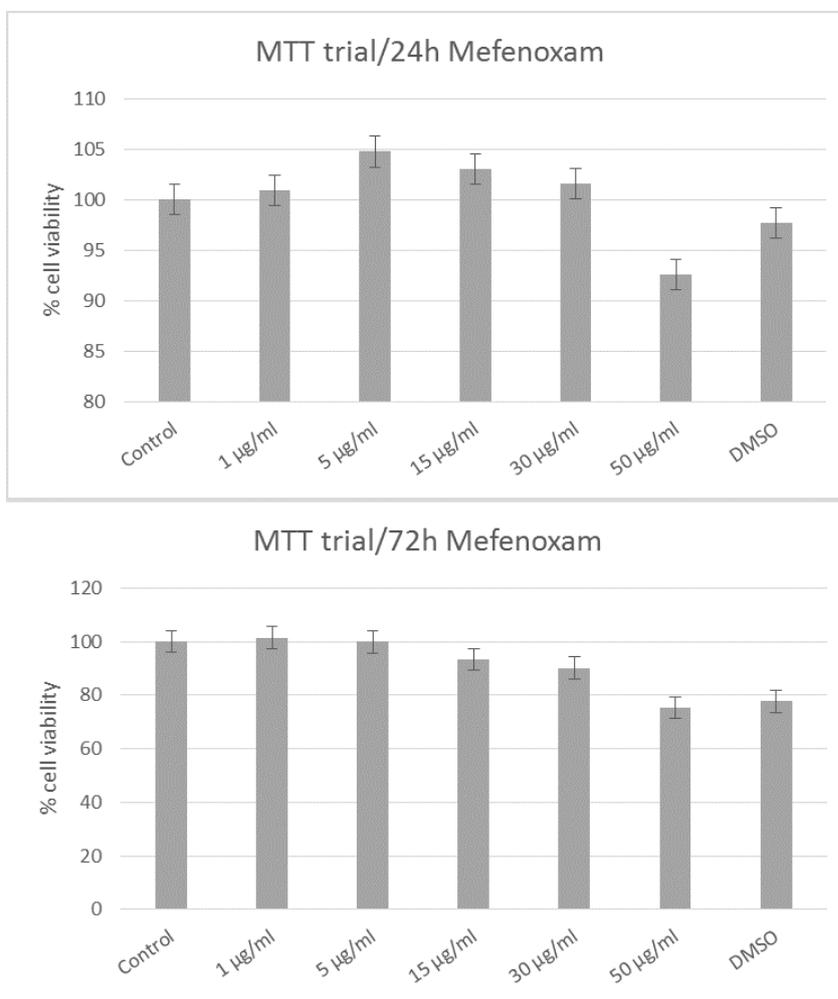
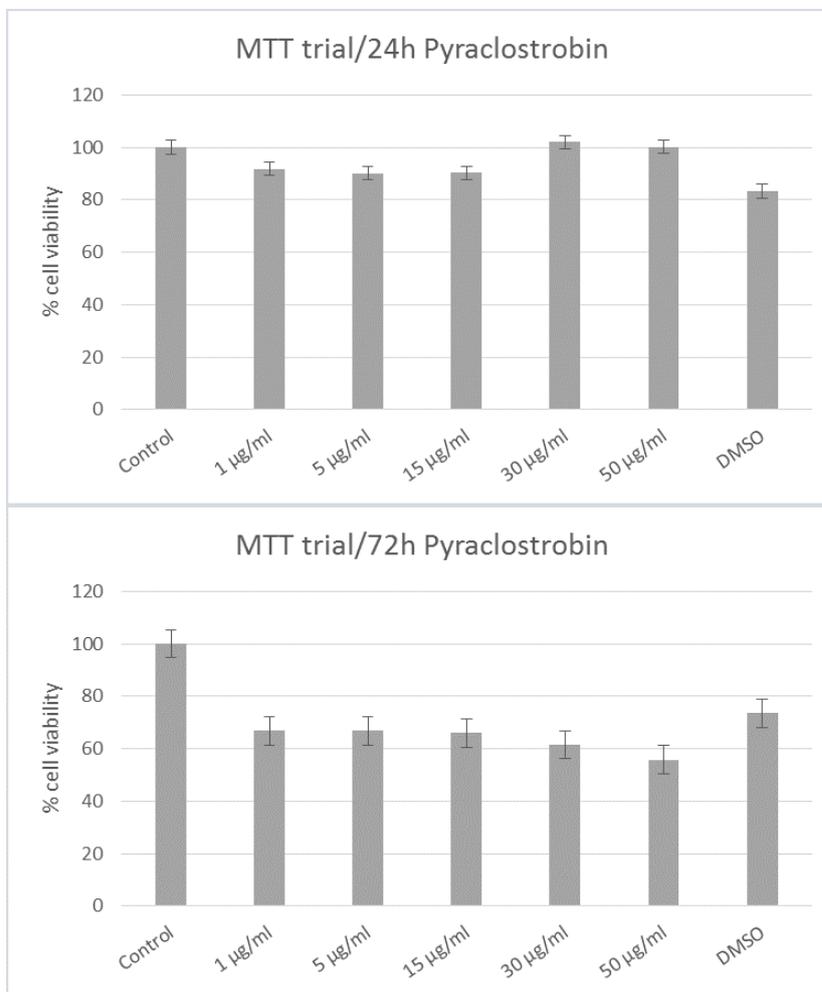


Figura 2. Citotoxicidade de mefenoxam: viabilidade celular da linhagem de fibroblastos de camundongos (BALB/c 3T3) avaliada pelo método do MTT [(brometo 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazólio) após 24h e 72h de exposição às concentrações [1, 5, 15, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$] de mefenoxam. Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média ($p < 0,05$).



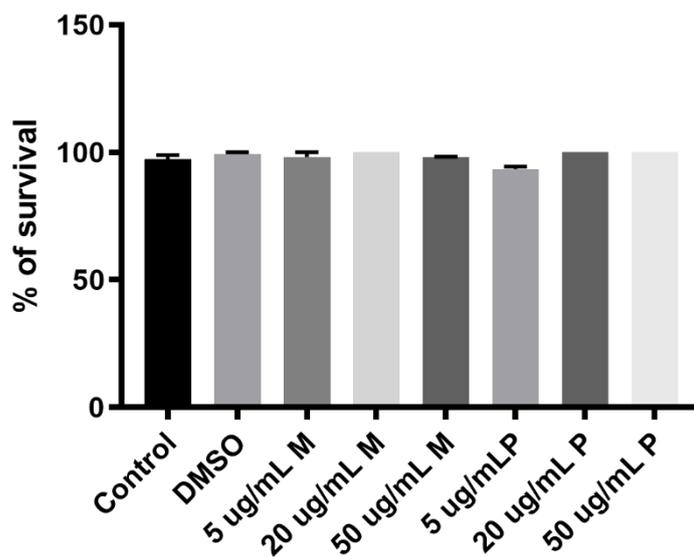
% cell viability: alterações na viabilidade celular demonstrado através de porcentagem; **Control:** controle positivo da linhagem celular BALB/c 3T3 sem tratamento; **[1, 5, 15, 30, 50 $\mu\text{g/mL}$]:** concentrações de mefenoxam avaliadas; **DMSO:** controle negativo do diluente dimetilsulfóxido.

Figura 3. Citotoxicidade de pyraclostrobin: viabilidade celular da linhagem de fibroblastos de camundongos (BALB/c 3T3) avaliada pelo método do MTT [(brometo 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazólio) após 24h e 72h de exposição às concentrações [1, 5, 15, 30 e 50 µg/mL] de pyraclostrobin. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média ($p < 0,05$).



% cell viability: alterações na viabilidade celular demonstrado através de porcentagem; **Control:** controle positivo da linhagem celular BALB/c 3T3 sem tratamento; **[1, 5, 15, 30, 50 µg/mL]:** concentrações de pyraclostrobin avaliadas; **DMSO:** controle negativo do diluente dimetilsulfóxido.

Figura 4. Toxicidade de mefenoxam e pyraclostrobin frente ao modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*: sobrevivência de larvas no estágio L1 de *C. elegans* após exposição às concentrações [5, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$] de mefenoxam (M) e pyraclostrobin (P) durante 1h de exposição. Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média ($p < 0,05$).



C. elegans survival curve at L1 stage after 1h treatment.

% of survival: % de sobrevivência das larvas L1 de *C. elegans* após 1h de tratamento; **Control:** controle de larvas L1 de *C. elegans* sem tratamento; **DMSO:** controle negativo do diluente dimetilsulfóxido; **[5, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$]:** concentrações de mefenoxam (M) e pyraclostrobin (P) avaliadas.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

Em relação ao perfil de suscetibilidade dos isolados de *P. insidiosum*, verifica-se a ação inibitória de mefenoxam e de pyraclostrobin sobre todos os isolados testados, sendo este o primeiro estudo que demonstra a atividade *in vitro* de pyraclostrobin sobre *P. insidiosum*.

Evidencia-se diferenças estruturais superficiais em hifas tratadas com ambos os fitoantifúngicos, indicando alterações na superfície celular do oomiceto expostos aos compostos testados.

A linhagem celular de fibroblastos de camundongos (BALB/c 3T3), não demonstrou efeitos tóxicos quando exposta a mefenoxam e pyraclostrobin durante 24h e 72h, através da técnica do MTT. Contudo, salienta-se a importância da realização de novos testes em uma maior gama de linhagens celulares, utilizando diferentes técnicas de avaliação.

No modelo *in vivo* avaliado (*C. elegans*, estágio larval L1), ambos os antifúngicos demonstraram ser inócuos nas concentrações testadas.

Pesquisas adicionais são necessárias envolvendo mefenoxam e pyraclostrobin, buscando elucidar possíveis mecanismos envolvidos na ação anti-*P.insidiosum* destes compostos e na possibilidade de desenvolvimento de protocolos terapêuticos efetivos para a pitiose.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J. et al. Phylum Oomycota. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 4 ed. Cap. 23, p. 683-737, 1996.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; BOSCO, S. M. G.; SFORCIN, J. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47, n. 4, p. 863-869, 2016.
- BARTLETT, D.W. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**. v. 58, p. 649-662, 2002.
- BONA, E. et al. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? **Journal of Applied Microbiology**. v. 12, p. 1530-1545, 2016.
- BOSCO, S.M.G. et al. Human phytiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.
- BOTTON, S. A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**. v. 62, p. 1225-1229, 2011.
- BROWN, 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.
- CAVALHEIRO, A. S. et al. In Vitro Activity of Terbinafine Combined with Caspofungin and Azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 53, p. 2136 – 2138, 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard – second edition. CLSI document M38-A2 (ISBN 1-56238-668-9). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
- CRIDGE, S. M. H.; VERNON C. L.; ANDREW J. M. Mefenoxam, Itraconazole, and Terbinafine Combination Therapy for Management of Pythiosis in Dogs (Six Cases). **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 56 ed. 6, p. 307, 2020.
- DARQUE, A. et al. Synthesis and biological evaluation of new heterocyclic quinolinones as anti-parasite and anti-HIV drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 5962, 2009.

DICK, M.W. 2001. **Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms.** Kluwer Academic Publishers, London, England, p. 1-670, 2001.

ECKER et al. Chalcogenozidovudine derivatives with anti-tumor activity: comparative toxicities in cultured human mononuclear cells. **Toxicological Sciences.** v. 160, n.1, p. 30–46, 2017.

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.

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

FLOSS, H.G., et al. Further studies on the biosynthesis of pyrrolnitrin from tryptophan by *Pseudomonas*. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 45 p. 781–787, 1971.

FONSECA, A. O. S. et al. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 69, p. 1564–1567, 2014.

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.

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

GISI, U., SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology.** v. 22, p. 157 – 167, 2008.

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

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

HUMMEL et al. Successful management of gastrointestinal pythiosis in a dog using itraconazole, terbinafine, and mefenoxam. **Medical Mycology.** v. 49, p. 539–542, 2011.

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

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 Chemotherapy.** v. 58, p.5621–5625, 2014.

- KAUFMAN, L.; MENDOZA, L.; STANDARD, P. G. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.28, p. 1887-1890, 1990.
- KIRK et al. **Dictionary of the Fungi**. CABI Europe, Wallingford. 2008.
- KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 569-576, 2006.
- KRAJAEJUN, T. et al. *In vitro* antimicrobial activity of volatile organic compounds from *Muscodor crispans* against the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 43 n. 6, p.1474-1483, 2012.
- KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Disease**. v. 19, S1-7, 1994.
- LEAL, A.T. et al. Pitiose. **Ciência Rural**. v. 31, n. 4, p.735-743, 2001.
- LOBO, V. L. S. Efeito do tratamento químico de sementes de arroz no controle da brusone nas folhas e na qualidade sanitária e fisiológica das sementes. **Tropical Plant Pathology**. v. 33, n. 2, p. 162-166, 2008.
- 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, E. 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, 2018.
- MAENO, S. et al. Successful medical management of *Pythium insidiosum* keratitis using a combination of minocycline, linezolid, and chloramphenicol. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**. v. 15, 2019.
- MARQUES, A.S et al. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 81, n. 5, p. 483-5, 2006.
- MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v. 104, n. 1, p. 59-62, 1988.
- 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 Médicale**. v. 6, p. 151-164, 1996.

- MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.
- MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**. v. 21, p. 2797 – 2804, 2003.
- MENDOZA, L. et al. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**. v. 47, n. 1-2, p. 14-23, 2004.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Immunological studies on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, n.6, p. 227-231, 1982.
- MILLER, R.I. Investigations into the biology of three ‘phycomycotic’ agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**. v.81, p.23-28, 1983.
- 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.
- PÉREZ, R. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**. v. 109 p. 121 – 128, 2005.
- PESAVENTO, P.A. et al. Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Veterinary Pathology**. v. 45, p. 538 – 541, 2008.
- PIRES, L. et al. Photodynamic Therapy in *Pythium insidiosum* – An In Vitro Study of the Correlation of Sensitizer Localization and Cell Death. **PLoS ONE**. v. 9, n.1, e85431, 2014.
- POSEL, C. et al. Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. **PLoS one**. v. 7, e50293, 2012.
- POSRI, P. et al. Antifungal activity of compounds from the stems of *Dalbergia stipulacea* against *Pythium insidiosum* **Natural Product Research**. v. 2, p. 1-8, 2019.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Seed treatment with pyroquilon for the control of leaf blast in Brazilian upland rice. **International Journal of Pest Management**. v. 39, p. 347-353, 1993.
- PUPAIBOOL, J. et al. Human Pythiosis. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, p. 517 – 518, 2006.
- RAMAPPA, M. et al. Successful medical management of presumptive *Pythium insidiosum* keratitis. **Cornea**. v. 36, p. 511–514, 2017.

- REANPANG, T. et al. Vascular pythiosis of the lower extremity in northern Thailand: Ten years' experience. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**. v. 14, p. 245–250, 2015.
- RIET-CORREA, F. et al. Surto de zigomicose rinofaríngea em ovinos na Paraíba, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, p. 29 – 35, 2008.
- ROGERO et al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**. v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- ROS CASTELLAR, F. et al. Intraocular minocycline for the treatment of ocular pythiosis. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v. 74, p. 821– 825, 2017.
- 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.
- SANAVRIA A., F.V.E. et al. Pitiose em eqüinos: relato de cinco casos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 22, n. 4, p. 170-173, 2000.
- SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**. v. 141, n. 13, p. 123-125, 1998.
- SANTURIO, J. M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, p. 1-14, 2006.
- SANTURIO, J. M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**. v. 163, p. 276–277, 2008.
- SCHURKO, A. M. et al Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia**. v. 95, p. 200 – 208, 2003.
- 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, p. 1388 – 1393, 1998.
- SILVA, G. B. et al. Resposta de cultivares melhoradas de arroz ao tratamento de sementes com pyroquilon no controle da brusone nas folhas. **Summa Phytopathologica**. v. 28, p. 289 – 291, 2002.
- SOUTO, E.P.F. et al. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 71, n. 3, 2019.
- SRIPHANA, U. et al. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia**. v. 91, p. 39-4, 2013.

- SRIPHANA U. et al. Clauraila E from the roots of *Clausena harmandiana* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Archives of Pharmacal Research**. v. 36, p. 1078-1083, 2013.
- TABOSA, I.M., et al. Pitiose cutânea em eqüinos no semi-árido da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 51, n. 1, p. 27-30, 1999.
- TABOSA, I.M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**. v. 41, p. 412–415, 2004.
- THIANPRASIT, M. Fungal infection in Thailand. **The Japanese Journal of Dermatology**. v. 96, p. 1343 – 1345, 1986.
- THIANPRASIT, M. Human pythiosis. **Tropical Dermatology**. v. 4, p. 1 – 4, 1990.
- THOMAS, R. C.; LEWIS, D. T. Pythiosis in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**. v. 20, p. 63 – 74, 1998.
- THONGSRI, Y. et al. Detection of diketopiperazine and pyrrolnitrin, compounds with anti-*Pythium insidiosum* activity, in a *Pseudomonas stutzeri* environmental strain. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc**. v. 158, n. 3, p. 378-383, 2014.
- TRISCOTT, J.A. et al. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.
- VALENTE, J. S. S. et al. *In Vitro* Susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* Essential Oils Combinations. **Mycopathologia**, v. 181, p. 617-22, 2016.
- VALENTE, J. S. S. et al. In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**. v. 57, n. 7, p. 858-863, 2019.
- VILELA, R. et al. *Pythium insidiosum* isolated from infected mosquito larvae in central Brazil. **Acta Tropica**. v. 185, p. 344-348, 2018.
- WEIBLEN, C. et al. Soroprevalência da pitiose equina no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 46, n. 1, p. 126-131, 2016.
- WHITE, A. G. et al. Successful management of cutaneous paralagenidiosis in a dog treated with mefenoxam, minocycline, prednisone, and hyperbaric oxygen therapy. **Medical Mycology Case Reports**, v. 29, p. 38-42, 2020.
- WITTAYAPIPATH, K. et al. Analysis of xanthyletin and secondary metabolites from *Pseudomonas stutzeri* ST1302 and *Klebsiella pneumoniae* ST2501 against *Pythium insidiosum*. **BMC Microbiology**. v. 19, n. 78, 2019.

ZANETTE, R. A. et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to garlic extract. **African Journal of Microbiology Research**. v. 5, p. 5316-5318, 2011.