

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

**ATIVIDADE *IN VITRO* DA TERBINAFINA E ASSOCIAÇÕES  
SOBRE *PYTHIUM INSIDIOSUM***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ayrton Sydnei Cavalheiro**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2009**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DA TERBINAFINA E ASSOCIAÇÕES  
SOBRE *PYTHIUM INSIDIOSUM***

**por**

**Ayrton Sydnei Cavalheiro**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

**Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE *IN VITRO* DA TERBINAFINA E ASSOCIAÇÕES  
SOBRE *PYTHIUM INSIDIOSUM***

elaborada por  
**Ayrton Sydnei Cavalheiro**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Janio Moraes Santurio, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Daniela Isabel Brayer Pereira, Dra.**  
(UFPel)

---

**Sônia Terezinha dos Anjos Lopes, Dra.**  
(UFSM)

Santa Maria, janeiro de 2009.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

**Darci Francisco Cavalheiro e  
Ivone Maria Cavalheiro**

por seu amor, dedicação e apoio,

compartilho esta conquista com vocês.

*“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão...  
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a vida é bela sim  
e que eu sempre dei o melhor de mim...  
e que valeu a pena.”*

Mário Quintana

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo milagre da vida e por permitir que eu chegasse até aqui, me proporcionando saúde e iluminando meus caminhos, muitas vezes tortuosos e estreitos, mas sempre guiado por uma força maior.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, tanto emocional quanto financeiro, não medindo esforços para que sempre pudesse ter tranqüilidade para seguir na vida acadêmica, sem nunca ousar pensar em desistir de meus ideais. Serei eternamente grato a vocês.

Aos meus irmãos, Othávio e Letícia, pela presença contínua em minha vida.

Aos meus familiares, minha base, meu chão, pela ajuda incondicional, otimismo, fé, crença, vibração com minhas vitórias e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, não só de mestrado, mas também de graduação, Professor Dr. Janio Morais Santurio, exemplo de pesquisador, a quem devo grande parte do meu aprendizado, através de suas orientações, disponibilidade, tolerância, amizade e acima de tudo por seu exemplo de dignidade, persistência e amor à profissão, não existem palavras que consigam expressar minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, meu co-orientador durante o mestrado, mas também orientador durante toda minha graduação, não tenho palavras para agradecer por sua amizade, apoio, disposição, empenho, tolerância, compreensão e auxílio, imprescindível e incondicional, na concretização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria por todos estes anos de ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao LAPEMI por me acolher durante estes ótimos anos e oportunizar a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos amigos que tiveram paciência e me toleraram nos momentos de mau humor.

Aos amigos do LAPEMI, Stelinha, Bebel, Grazi, Juju, Dani, João, Régis, Patrique, Zé Frávio, Camila, Estevam, Fabi, Lisi, Déia, Leila, Caru, Liliane, Ana Dieice, Marina, Érico, Deise, Pati, Fran, PG, Tati, Débora, Elenize, Dani Oliveira, Luana, enfim, a todos aqueles que passaram pelo laboratório durante estes bons anos que lá permaneci. Queridos

colegas, muito obrigado por todos os ótimos momentos que compartilhamos tanto no trabalho quanto nos ambientes festivos; podem ter certeza que nunca esquecerei.

Enfim, obrigado a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento da minha pesquisa e que acreditaram e torceram por minha vitória!

*“Cada pessoa que passa na nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa pela nossa vida passa sozinha, não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”*

Charles Spencer Chaplin

*“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver...”*

*Martin Luther King*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ATIVIDADE *IN VITRO* DA TERBINAFINA E ASSOCIAÇÕES SOBRE *PYTHIUM INSIDIOSUM***

Autor: Ayrton Sydnei Cavalheiro

Orientador: Janio Morais Santurio

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 09 janeiro de 2009.

Pitiose é uma doença granulomatosa de humanos e animais que ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo. Ela é causada por um microrganismo aquático semelhante aos fungos chamado *Pythium insidiosum*. O tratamento para pitiose é incerto, com um prognóstico desfavorável tanto para humanos como para os animais. Com isso, novas possibilidades para tratamentos devem ser examinados. Desta forma, avaliou-se a atividade *in vitro* da terbinafina (0,25 a 32 mg/L) sozinha e em combinação com caspofungina (0,5 a 128 mg/L), miconazol (0,25 a 32 mg/L), fluconazol (0,125 a 64 mg/L), cetoconazol (0,125 a 64 mg/L), anfotericina B (0,25 a 16 mg/L), fluvastatina (0,125 a 64 mg/L), rifampicina (0,25 a 64 mg/L), metronidazol (0,25 a 128 mg/L) e ibuprofeno (8 a 2.048) frente a 17 isolados clínicos de *P. insidiosum*. As atividades antifúngicas foram avaliadas por microdiluição em caldo, baseado no protocolo M38-A para fungos filamentosos, adaptado para *P. insidiosum*, e pela técnica de *checkerboard*. Sinergismos foram observados nas combinações de terbinafina mais caspofungina (41,18%), fluconazol (41,18%), anfotericina B (41,18%), cetoconazol (29,41%) e miconazol (11,76%). As combinações de terbinafina mais rifampicina e terbinafina mais metronidazol foram indiferentes para 94,12% das cepas. Terbinafina mais ibuprofeno foi indiferente para 82,35% dos isolados. Antagonismos foram observados nas combinações de terbinafina mais fluvastatina (35,30%) ou rifampicina (5,88%). As combinações de terbinafina mais caspofungina, terbinafina mais fluconazol e terbinafina mais anfotericina B podem ter significativo potencial terapêutico para o tratamento da pitiose.

Palavras-chave: Pitiose, *Pythium insidiosum*, atividade antifúngica, terbinafina, *checkerboard*.



## ABSTRACT

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### ***IN VITRO* ACTIVITY OF TERBINAFINE AND ASSOCIATIONS AGAINST *PYTHIUM INSIDIOSUM***

Autor: Ayrton Sydnei Cavalheiro

Orientador: Janio Morais Santurio

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 09 de janeiro de 2009.

Pythiosis is a granulomatous disease of human and animals that occurs primarily in tropical and subtropical areas of the world. It is caused by an aquatic, fungus-like organism called *Pythium insidiosum*. The treatment for pythiosis is uncertain, with an unfavorable prognosis for human and animals. Therefore, new possibilities for treatments must be examined. We have evaluated the *in vitro* activities of terbinafine (0.25 to 32 mg/L) alone and in combination with caspofungin (0.5 to 128 mg/L), miconazole (0.25 to 32 mg/L), fluconazole (0.125 to 64 mg/L), ketoconazole (0.125 to 64 mg/L), amphotericin B (0.25 to 16 mg/L), fluvastatin (0.125 to 64 mg/L), rifampicin (0.25 to 64 mg/L), metronidazole (0.25 to 128 mg/L) and ibuprofen (8 to 2,048) against 17 clinical isolates of *P. insidiosum*. Antifungal activities were assayed by broth microdilution, based on protocol M38-A for filamentous fungi, adapted to *P. insidiosum*, as well as the checkerboard method. Synergisms were observed in combinations of terbinafine plus caspofungin (41.18%), fluconazole (41.18%), amphotericin B (41.18%), ketoconazole (29.41%) and miconazole (11.76%). The combinations of terbinafine plus rifampicin and terbinafine plus metronidazole were indifferent for 94.12% of strains. Terbinafine plus ibuprofen was indifferent for 82.35% of strains. Antagonisms were observed in combinations of terbinafine with fluvastatin (35.30%) or rifampicin (5.88%). The combinations of terbinafine plus caspofungin, terbinafine plus fluconazole and terbinafine plus amphotericin B may have significant therapeutic potential for treatment of pythiosis.

Key words: Pythiosis, *Pythium insidiosum*, antifungal activity, terbinafine, checkerboard.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Table 1. <i>In vitro</i> activity of terbinafine, caspofungin and azoles against isolated from <i>Pythium insidiosum</i> (mg/L). .....	49
Table 2. <i>In vitro</i> activity of terbinafine plus fluconazole, miconazole, ketoconazole and caspofungin against <i>Pythium insidiosum</i> .....	50

#### Tabelas Suplementares

Tabela 1 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e fluconazol, individualmente e em associação, contra isolados de <i>Pythium insidiosum</i> . .....	51
Tabela 2 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e miconazol, individualmente e em associação, contra isolados de <i>Pythium insidiosum</i> .....	52
Tabela 3 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e caspofungina (CAS), individualmente e em associação, contra isolados de <i>Pythium insidiosum</i> .....	53
Tabela 4 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e cetoconazol, individualmente e em associação, contra isolados de <i>Pythium insidiosum</i> .....	54
Tabela 5 – Atividade <i>in vitro</i> das associações de terbinafina à caspofungina, miconazol, cetoconazol e fluconazol contra isolados de <i>Pythium insidiosum</i> .....	55

### ARTIGO 2

Table 1. <i>In vitro</i> activity of terbinafine, fluvastatin, rifampicin, metronidazole, ibuprofen and amphotericin B against isolated from <i>Pythium insidiosum</i> . .....	69
Table 2. <i>In vitro</i> activity of terbinafine (TRB) plus rifampicin (RIF), fluvastatin (FVN), metronidazole (MTZ), ibuprofen (IBP) or amphotericin B (AMB) against <i>Pythium insidiosum</i> . (mg/L) .....	70

#### Tabelas Suplementares

Tabela 1 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e rifampicina, individualmente e em associação, contra cepas de <i>Pythium insidiosum</i> .....	71
Tabela 2 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e fluvastatina, individualmente e em associação, contra cepas de <i>Pythium insidiosum</i> .....	72
Tabela 3 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e metronidazol (MTZ), individualmente e em associação, contra cepas de <i>Pythium insidiosum</i> .....	73
Tabela 4 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e ibuprofeno, individualmente e em associação, contra cepas de <i>Pythium insidiosum</i> .....	74
Tabela 5 - Atividade <i>in vitro</i> da terbinafina e anfotericina B (AMB), individualmente e em associação, contra cepas de <i>Pythium insidiosum</i> .....	75
Tabela 6 – Atividade <i>in vitro</i> das associações de terbinafina à fluvastatina, rifampicina, metronidazol, ibuprofeno e anfotericina B contra isolados de <i>Pythium insidiosum</i> . .....	76

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Fármacos.....</b>	<b>14</b>
2.1.1. Terbinafina.....	15
2.1.2. Derivados azólicos.....	15
2.1.2.1. Miconazol .....	16
2.1.2.2. Fluconazol.....	16
2.1.2.3. Cetoconazol .....	17
2.1.3. Anfotericina B.....	18
2.1.4. Caspofungina .....	18
2.1.5. Rifampicina.....	19
2.1.6. Metronidazol.....	20
2.1.7. Ibuprofeno.....	20
2.1.8 Fluvastatina.....	21
<b>2.2. <i>Pythium insidiosum</i>.....</b>	<b>21</b>
2.2.1. Histórico.....	22
2.2.2 Taxonomia .....	23
<b>2.3. Pitiose .....</b>	<b>24</b>
2.3.1. Tratamento .....	28
2.3.1.1 Imunoterapia .....	28
<b>2.4 Terapia da pitiose e atividade antifúngica de combinações de fármacos .....</b>	<b>30</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Local do experimento .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Isolados de <i>P. insidiosum</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Fármacos.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4. Avaliação da atividade antifúngica .....</b>	<b>33</b>
3.4.1. Preparação do inóculo.....	34
3.4.1.1. Zoosporogênese .....	34
3.4.2. Testes de Susceptibilidade .....	34
3.4.2.1 Testes individuais .....	35
3.4.2.2 Testes de Susceptibilidade com associações e fármacos ( <i>checkerboard</i> ) .....	35
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>37</b>
<b>ARTIGO 1 .....</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>56</b>
<b>ARTIGO 2 .....</b>	<b>57</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Pitiose é uma doença emergente, infecciosa e com risco de morte, causada pelo organismo oomyceto *Pythium insidiosum*, pertencente ao reino Chromista (Stramenopila). Esta é a única espécie conhecida de *Pythium* que infecta seres humanos e animais, em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (MENDOZA *et al.*, 1996; KAUFMAN 1998; TABOSA *et al.*, 2004; RIVIERRE *et al.*, 2005). *P. insidiosum* apresenta duas formas: hifas com ramificações perpendiculares e zoósporos biflagelados (DE COCK, 1987). Os zoósporos, em ambiente aquático, nadam para invadir e penetrar nos tecidos do hospedeiro (MENDOZA *et al.*, 1993). Através de análise filogenética demonstrou-se que as espécies de *Pythium* estão mais relacionadas às diatomáceas e algas do que aos fungos verdadeiros (SCHURKO *et al.*, 2003). Em humanos a pitiose foi pela primeira vez documentada em 1985 (IMWIDTHAYA, 1994a; DE COCK, 1987). Desde então, vários casos humanos têm sido notificados, sendo a doença marcada por elevadas taxas de morbidade e mortalidade (TANPHAICHITRA, 1989; CHETCHOTISAKD *et al.*, 1992; VIRGILE *et al.*, 1993; WANACHIWANAWIN *et al.*, 2004; BOSCO *et al.*, 2005; PUPAIBOOL *et al.*, 2006). Pode ser vista nas formas cutânea e subcutânea com lesões nos membros, áreas orbital e periorbital, também podendo ter um acometimento sistêmico envolvendo o sistema cardiovascular, o que geralmente provoca oclusão arterial. A maioria dos casos sistêmicos tem sido relatada na Tailândia, em pessoas portadoras de  $\alpha$  ou  $\beta$  Talassemia, doença de caráter hereditário, também chamada de “anemia mediterrânea” e é caracterizada por deficiência ou ausência da produção das cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$  da hemoglobina, respectivamente (LI *et al.*, 2006). Vários tratamentos já foram utilizados, entretanto a intervenção cirúrgica com a retirada de toda a área afetada permanece como o tratamento mais efetivo (KRAJAEJUN *et al.*, 2006).

Entre os animais, a espécie equina é a mais atingida, vindo logo após, a espécie canina (RODRIGUES *et al.*, 2006). Casos esporádicos também têm sido relatados em bovinos (SANTURIO *et al.*, 1998), felinos (BISSONNETTE, 1991), ovinos (SANTURIO *et al.*, 2008) e espécies não domésticas como jaguar (CAMUS *et al.*, 2004), urso (GROOTERS, 2003) e camelo (WELLEHAN *et al.*, 2004). O agente etiológico é atualmente pertencente ao Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *Pythium insidiosum* (MENDOZA & NEWTON, 2005).

O tratamento de infecções causadas pelo *P. insidiosum* em animais e humanos é complicado pelas características do agente, sobretudo a composição de sua parede celular e membrana plasmática. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede celular, enquanto o *P. insidiosum* contém celulose e  $\beta$ -glucanos. A membrana plasmática não contém esteróides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria dos agentes antifúngicos (FOIL, 1996). Devido a estas características, os tratamentos convencionais à base de monoterapia antifúngica têm sido ineficazes.

No caso da pitiose eqüina, o tratamento tradicional é a excisão cirúrgica. Esta requer a retirada de toda a área afetada como medida de segurança para evitar recidivas (MILLER, 1981). Todavia, o tratamento cirúrgico apresenta bons resultados somente em lesões pequenas e superficiais, onde seja possível a retirada de toda a área afetada. O sucesso das diferentes formas de tratamento é variável e, em muitos casos, influenciado pelo tamanho e tempo de evolução da lesão, idade e estado nutricional.

A imunoterapia surgiu como uma alternativa para o tratamento da pitiose eqüina quando MILLER (1981) desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do próprio agente (hifas sonicadas), avançando de maneira significativa a partir de 1998 (SANTURIO *et al.*, 2006). O índice de eficiência obtido na imunoterapia foi de 53%; e 75% quando associado à cirurgia (MILLER, 1981; MILLER & CAMPBELL, 1982b).

Os resultados obtidos com os agentes antifúngicos têm sido variáveis, tanto *in vitro* como *in vivo*. SEKHON *et al.* (1992) observou que os poliênicos (anfotericina B, hamicina) não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azóis fluconazol, cetoconazol e miconazol inibiram o crescimento *in vitro* de isolados de *P. insidiosum*. Em outro teste, os antimicóticos anfotericina B, flucitosina, miconazol, e griseofulvina não inibiram o crescimento do fungo, enquanto o itraconazol apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *P. insidiosum* (SHENEP *et al.*, 1998). Neste estudo a associação de terbinafina e itraconazol apresentou efeito sinérgico sendo utilizada com sucesso no tratamento de um menino com infecção facial. TRISCOTT *et al.* (1993) descreveram o sucesso da anfotericina B no tratamento de dois casos de infecção periorbital em humanos, contrariando os resultados obtidos nos testes *in vitro*. Em eqüinos, obteve-se 50% de eficiência em um tratamento associando-se a remoção cirúrgica à anfotericina B; 30% quando se utilizou somente anfotericina B e 20% dos casos não responderam aos tratamentos utilizados (MCMULLAN *et al.*, 1977). Em recente estudo, ARGENTA *et al.* (2008) avaliaram a suscetibilidade de 30 isolados clínicos de *P. insidiosum* ao voriconazol, itraconazol e terbinafina através da técnica de macrodiluição e

*chequerboard*. A atividade combinada de terbinafina mais itraconazol ou voriconazol resultou em sinergismo contra 17% das cepas. Antagonismo não foi observado. PEREIRA *et al.* (2007) verificaram a suscetibilidade de 27 cepas de *P. insidiosum* à caspofungina *in vitro* e correlacionaram os resultados com a resposta terapêutica *in vivo* utilizando coelhos como modelo experimental. Os resultados obtidos mostraram que a caspofungina tem limitado efeito fungistático contra *P. insidiosum*.

A busca da melhor atividade antifúngica baseada na associação de fármacos é promissora. Diante das dificuldades terapêuticas frente a microrganismos como o *P. insidiosum*, a atividade antifúngica resultante de mecanismos sinérgicos requer urgente investigação.

Desta forma, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos com diferentes mecanismos de ação, bem como o possível efeito sinérgico obtido da combinação de agentes antifúngicos com fármacos de outras classes farmacêuticas, tem estimulado grande interesse na combinação de terapias antifúngicas (JOHNSON *et al.*, 2004). Em função disso, numerosos testes de atividade *in vitro* têm explorado as interações entre os agentes antifúngicos contra diversos fungos patogênicos.

Diante destas considerações, o objetivo do presente estudo foi verificar a suscetibilidade *in vitro* de 17 isolados do oomiceto *P. insidiosum* frente ao antifúngico terbinafina e suas associações com miconazol, fluconazol, cetoconazol, caspofungina, anfotericina B, fluvastatina, rifampicina, ibuprofen e metronidazol utilizando técnica de microdiluição em caldo, baseado na Norma M38-A2 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos: Norma aprovada. CLSI, 2008), adaptado para *P. insidiosum*.

## **2. REVISÃO**

### **2.1. Fármacos**

O atual arsenal de drogas antifúngicas atua em um número limitado de processos celulares. A maior parte dos fármacos antifúngicos que estão em uso clínico atua sobre a biossíntese do ergosterol, que é o principal esterol nas membranas celulares fúngicas e é semelhante ao colesterol nas células de mamíferos. Ergosterol é o alvo dos poliênicos, que inclui a anfotericina B, uma droga que tem sido explorada clinicamente por mais de 50 anos. No entanto, sua utilização tem sido menos indicada devido à sua toxicidade ao

paciente, provavelmente por efeitos às membranas celulares contendo colesterol. Outros passos na biossíntese do ergosterol são alvos para as alilaminas, tiocarbamatos, morfolinás e azólicos (COWEN, 2008). Uma nova classe de antifúngicos que recentemente tornou-se disponível foram as equinocandinas. Elas atuam bloqueando a síntese da parede celular através da inibição da enzima  $\beta$ -(1,3) - d-glucano sintetase, tendo boa segurança e um amplo espectro de atividade (COWEN, 2008).

#### 2.1.1. Terbinafina

A terbinafina é um composto pertencente ao grupo das alilaminas. Este antifúngico atua ao inibir, seletivamente, a enzima esqualeno epoxidase, a qual está envolvida na síntese do ergosterol, importante para a formação da membrana fúngica (BENNETT, 2006). É um fungicida queratinofílico, altamente lipofílico e extremamente eficaz contra dermatófitos *in vitro* e *in vivo* (DAVIS & BALFOURD, 1995; GHANNOUM, 1999), bem como contra fungos filamentosos, dimórficos e dematiáceos, e algumas espécies de leveduras (BALFOURD & FAULDS, 1992). Quando administrada por via oral é rapidamente absorvida e captada pela pele, unhas e tecido adiposo; se a administração for tópica, penetra facilmente na pele e mucosas (BENNETT, 2006). É metabolizada no fígado pelo sistema citocromo P-450 e os metabólitos são eliminados na urina. Pode ser encontrada no plasma de 4 a 8 semanas após uma terapia prolongada. Ela não é recomendada em pacientes com insuficiência hepática, já que, nesta condição, os níveis plasmáticos do fármaco são aumentados de forma imprevisível. O medicamento é bem tolerado, com uma baixa incidência de desconforto gastrointestinal, dor de cabeça ou erupção cutânea. Raramente hepatotoxicidade, neutropenia grave ou necrose epidérmica tóxica podem ocorrer. Terbinafina (Lamisil<sup>1</sup>) pode ser encontrada na forma de comprimidos de 250 mg.

#### 2.1.2. Derivados azólicos

Os derivados azóis são compostos sintéticos que podem ser classificados em imidazóis ou triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico. Entre os imidazóis estão cetoconazol, miconazol e clotrimazol. Como regra, miconazol e

---

<sup>1</sup> Cloridrato de terbinafina, Novartis Biociências S.A.

clotrimazol são usados como terapia tópica. Os derivados triazóis são representados pelo itraconazol, fluconazol e voriconazol. Os azóis são bem tolerados, têm atividade contra uma variedade de fungos patogênicos e tem sido a classe de antifúngicos mais amplamente utilizada durante décadas. Inibem a enzima lanosterol 14a-demetilase (codificada pelo gene ERG11) e, por isso, bloqueiam a produção de ergosterol e provocam a acumulação de um esteroide intermediário tóxico (lanosterol) (COWEN, 2008). A especificidade das drogas azólicas resulta da sua maior afinidade pelas enzimas fúngicas do citocromo P450 do que pelas enzimas humanas do citocromo P450. Os imidazóis apresentam um grau de especificidade menor do que os triazólicos, o que explica sua maior incidência de interação de drogas e de efeitos adversos. A reação adversa mais comum é um pequeno distúrbio gastrointestinal. Todos os azóis podem provocar anormalidades nas enzimas hepáticas e, muito raramente, hepatite (BENNETT, 2006).

#### 2.1.2.1. Miconazol

Miconazol é um dos antifúngicos mais tradicionais. Atualmente é utilizado em larga escala como antifúngico tópico ou por via oral para o tratamento das infecções fúngicas do trato gastrointestinal (BENNETT, 2006). Entretanto já foi muito utilizado por via parenteral para o tratamento de micoses sistêmicas (NEGRONI *et al.*, 1977; SUNG *et al.*, 1977; MCDUGALL *et al.*, 1982; ROLAN *et al.*, 1983). Possui meia-vida plasmática curta e deve ser administrado a cada oito horas. Atinge concentrações terapêuticas no tecido ósseo, nas articulações e no tecido pulmonar, mas não no sistema nervoso central. É inativado no fígado. Os efeitos adversos são relativamente raros, e os mais comuns consistem em distúrbios gastrointestinais, embora se tenha relatado a ocorrência de prurido, discrasias sangüíneas e hiponatremia. Podem surgir problemas durante o processo de administração (via endovenosa), como reações anafiláticas, febre e disritmias. O fármaco pode ter ação irritante sobre o endotélio dos vasos. Já foi relatada intoxicação quando administrado concomitantemente com fenitoína (ROLAN *et al.*, 1983) e outras interações adversas quando administrado juntamente com antagonistas dos receptores H1, terfenadina e astemizol (BENNETT, 2006). Em relação ao uso tópico, miconazol penetra facilmente na camada córnea da pele e permanece por mais de quatro dias após a aplicação. Menos de 1% é absorvido para o sangue (SILVA, 2006).

#### 2.1.2.2. Fluconazol



O fluconazol é um bistriazol fluorado, sendo um dos antifúngicos mais recentes. As concentrações plasmáticas são essencialmente iguais, seja a administração feita por via oral ou intravenosa, uma vez que este fármaco é quase totalmente absorvido pelo trato gastrointestinal, diferindo neste ponto do itraconazol e cetoconazol (BENNETT, 2006). É muito hidrossolúvel e penetra no líquido facilmente. As interações medicamentosas são mais raras porque o fluconazol é, de todos os derivados azólicos, o que menos age sobre as enzimas microsossomais hepáticas. Por causa desse efeito e melhor tolerância gastrointestinal, o fluconazol apresenta o maior índice terapêutico entre os derivados azólicos, permitindo posologia mais agressiva em diversas infecções fúngicas. A concentração plasmática máxima é de 4 a 8 µg/ml após doses repetidas de 100 mg. A excreção renal representa mais de 90% da eliminação, e a meia-vida de eliminação é de 25 a 30 horas. Fluconazol difunde-se rapidamente em fluidos corporais, incluindo leite materno, escarro e saliva; concentrações no LCR podem atingir 50% a 90% dos valores do plasma (BENNETT, 2006). É um agente fungistático que altera a funcionalidade da membrana plasmática fúngica pela depleção do ergosterol, seu componente de maior importância, através da inibição da enzima 14- $\alpha$ -lanosterol demetilase, necessária para a sua biossíntese (WU *et al.*, 2000; HAZEN *et al.*, 2000).

#### 2.1.2.3. Cetoconazol

O cetoconazol foi o primeiro derivado azólico oral usado em clínica. Distingue-se dos triazóis pela sua maior influência em inibir as enzimas do citocromo P450 dos mamíferos, isto é, ele é menos seletivo para o P450 fúngico do que os mais novos derivados azólicos. Por tal motivo, a administração sistêmica do cetoconazol não é usada rotineiramente, tendo uma aplicação quase que exclusivamente tópica, em doenças fúngicas dermatológicas. Mostra-se eficaz contra vários tipos diferentes de fungos, entretanto é comum a ocorrência de recidiva após tratamento aparentemente bem-sucedido. Distribui-se amplamente por todos os tecidos e líquidos teciduais, porém não atinge concentrações terapêuticas no SNC, a não ser que seja administrado em altas doses (SILVA, 2006). O principal risco do fármaco é a hepatotoxicidade, que é rara, mas que pode se tornar fatal. Pode ocorrer sem qualquer evidência clínica manifesta e evoluir após a interrupção do fármaco. Outros efeitos colaterais que podem ocorrer consistem em distúrbios gastrointestinais e prurido (BENNETT, 2006). Foi registrada uma inibição da

síntese de esteróides e testosterona pelo córtex supra-renal com altas doses, sendo esta última responsável pelo desenvolvimento de ginecomastia em alguns pacientes do sexo masculino. Podem ocorrer interações adversas com outros fármacos. A terfenadina, a ciclosporina e o astemizol interferem com enzimas metabolizantes, causando concentrações plasmáticas elevadas de cetoconazol ou da droga com a qual interage, ou de ambos. Os antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> e os antiácidos diminuem a absorção do cetoconazol e, por conseguinte, reduzem sua concentração plasmática (SILVA, 2006).

### 2.1.3. Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico e sua atividade antimicótica é, principalmente, dependente de sua ligação a uma fração esterol, primariamente o ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, interferindo, desta forma, na permeabilidade e nas funções de transporte. Forma poros na membrana, criando com a parte central hidrofílica da molécula um canal iônico transmembrana. Uma das conseqüências disso é a perda de íons K<sup>+</sup> intracelulares. Contudo, os efeitos da anfotericina B sobre a permeabilidade das membranas livres de esterol indicam que mecanismos adicionais também podem estar envolvidos (BENNETT, 2006). A anfotericina B exerce uma ação seletiva, ligando-se avidamente às membranas de fungos e de alguns protozoários e com menor avidéz às células de mamíferos, não havendo nenhuma ligação às bactérias. A especificidade relativa por fungos pode ser devido à maior avidéz da droga pelo ergosterol do que pelo colesterol, o principal esterol encontrado na membrana plasmática de células animais (BENNETT, 2006).

Quando administrada por via oral é pouco absorvida, razão pela qual só é administrada por esta via para infecções fúngicas do trato gastrointestinal. Nas infecções sistêmicas é complexada com desoxicolato de sódio e administrada na forma de suspensão por injeção intravenosa lenta. Outras preparações disponíveis para infusão intravenosa incluem a anfotericina complexada com lipídeos ou encapsulada em lipossomos. Além disso, pode ser administrada topicamente (SILVA, 2006).

### 2.1.4. Caspofungina

Caspofungina faz parte do grupo das equinocandinas, antifúngicos que atuam na parede celular dos fungos, inibindo a síntese das glucanas. É aplicada somente pela via

intravenosa, em dose de ataque de 70mg, seguida de 1 dose diária de 50mg (para infecções fúngicas sistêmicas em humanos). A droga é hidrossolúvel e se liga, em alta proporção, às proteínas plasmáticas. A meia-vida é de 9 a 11 horas, e os metabólitos são excretados pela urina e fezes (SILVA, 2006).

O mecanismo de ação da caspofungina ocorre ao nível da parede celular fúngica, com a inibição da síntese do  $\beta$ -(1-3)-glucano. Esse efeito provoca o desarranjo da parede celular e morte do fungo. A caspofungina é muito bem tolerada, observando-se apenas leves distúrbios gastrintestinais e ruborização infreqüentemente (COWEN, 2006).

Acredita-se na sua eficácia contra o *P. insidiosum*, pois este, como os demais oomicetos, apresenta grande quantidade de  $\beta$ -glucanas na parede celular. Entretanto, o alto custo desta droga tem tornado seu uso limitado (GROOTERS, 2003). A caspofungina apresenta atividade *in vitro* contra espécies de *Candida*, incluindo amostras resistentes a anfotericina B e fluconazol além de *Aspergillus* spp e outros fungos clinicamente importantes como *Alternaria*, *Curvularia*, *Paecilomyces variotii*, *Scedosporium apiospermum* e fungos dimórficos. Entretanto, apresenta pouca atividade contra *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporum* spp., *Rhizopus arrhizus* e *Fusarium* spp (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). Atividade fungicida tem sido observada em *Candida* spp, enquanto que estudos *in vitro* têm demonstrado efeito fungistático em *Aspergillus* spp. (LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). Em estudos experimentais com animais a caspofungina tem demonstrado atividade antifúngica no tratamento de candidíase e aspergilose disseminada (ABRUZZO *et al.*, 1997; PETRAITIENE *et al.*, 2002; GRAYBILL *et al.*, 1998), histoplasmose (GRAYBILL *et al.*, 1998), coccidiodomicose (GONZÁLEZ *et al.*, 2001) e infecções por *Pneumocystis carinii* (POWLES *et al.*, 1998). Em humanos, tem sido demonstrada eficácia clínica contra infecções causadas por *Candida* e *Aspergillus*, estando a caspofungina licenciada para o tratamento de aspergilose invasiva em pacientes que são refratários ou intolerantes a outras terapias, candidemias ou outras infecções causadas por *Candida* (KARTSONIS *et al.*, 2003).

#### 2.1.5. Rifampicina

A rifampicina é um antibiótico semi-sintético, derivado da rifampicina B, que é produzida pelo *Streptomyces mediterranei*. Atua através de sua ligação à RNA-polimerase-DNA-dependente nas células procarióticas, mas não nas células eucarióticas, inibindo a enzima. Penetra nas células fagocíticas e pode destruir os microrganismos intracelulares

(RANG *et al.*, 2004). É bem absorvida por via oral e alcança concentração plasmática máxima 2 a 4 horas após a ingestão. A dose oral de 600 mg (dose máxima diária) atinge concentração plasmática de 7 µg/mL. Aproximadamente 30% da droga são excretados na urina e o restante é excretado nas fezes. Está presente em concentração eficaz em muitos órgãos e líquidos do organismo, inclusive o líquido. Alguns efeitos adversos podem ocorrer, entre eles erupção cutânea, febre, náusea, vômito e agressão hepática (SILVA, 2006).

#### 2.1.6. Metronidazol

O metronidazol é um composto nitroimidazólico com baixo peso molecular. É quase completamente absorvido quando administrado por via oral. Com uma dose de 525 mg a cada 6 horas atingem-se níveis plasmáticos entre 18 e 25 µg/mL. Liga-se muito pouco às proteínas plasmáticas e possui uma meia-vida plasmática de 8 horas. No metabolismo do metronidazol formam-se cinco metabólitos principais, dos quais o mais importante é o derivado hidroxilado. Os outros são um metabólito ácido, o acetilmetronidazol, o glicuronídeo do metronidazol e o conjugado glicuronídeo de hidroximetronidazol. Contra bactérias, o mecanismo de ação do metronidazol abrange quatro etapas: penetração da droga na célula bacteriana; ativação redutora; efeito tóxico do derivado reduzido e liberação de produtos finais inativos. O metronidazol é um fármaco de potente ação bactericida. Esta ação tem início rápido e não é afetada pelo tamanho do inóculo, pelas necessidades nutritivas ou pela taxa de crescimento das bactérias. É ativo contra bactérias anaeróbias e microaerófilas. De modo geral, o metronidazol é bem tolerado. As reações mais simples são representadas por perturbações gastrintestinais leves, neutropenia reversível, sabor metálico, urina escura, exantema maculopapular, urticária, raramente erupção pustular, queimor vaginal e uretral e ginecomastia (SILVA, 2006).

#### 2.1.7. Ibuprofeno

O ibuprofeno é um antiinflamatório derivado do ácido propiônico, inibindo a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2), na mesma proporção e de forma irreversível, além de também inibir a ativação e a agregação de neutrófilos, a geração de radicais livres (agindo sobre as cininas e histamina na mediação da inflamação) e a liberação de enzimas lisossomais (SPINOSA *et al.*, 2002). Possui ainda ação analgésica e antipirética. É rapidamente absorvido após administração oral e o tempo de meia-vida é de

2 horas. Liga-se amplamente às proteínas plasmáticas, geralmente em proporções superiores a 90%. A via de eliminação é principalmente renal, devendo-se ter precaução quando há comprometimento da função renal. Efeitos tóxicos podem ser observados em cerca de 5 a 15% dos pacientes, e compreendem, principalmente, dor ou desconforto epigástrico, náuseas, vômitos, diarreia, azia, sensação de plenitude gastrointestinal e constipação (SILVA, 2006).

#### 2.1.8 Fluvastatina

As estatinas variam consideravelmente nas suas características farmacológicas, lipofílicas, na vida média, metabolismo e outras propriedades. Fluvastatina é lipofílica e circula no sangue ligada à proteína em 95 a 98%, sendo metabolizada no citocromo P450-2C9. É um agente redutor de colesterol, totalmente sintético, inibindo competitivamente a enzima HMG-CoA redutase, que é responsável pela conversão da HMG-CoA em mevalonato, um precursor de esteróis, inclusive do colesterol. Exerce seu efeito principal no fígado e é essencialmente um composto racêmico dos dois éritro enantiômeros, sendo que um deles exerce a atividade farmacológica. A inibição da biosíntese do colesterol reduz o colesterol nas células hepáticas, o que estimula a síntese dos receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e, portanto, aumenta a captação das partículas de LDL. O resultado final desses mecanismos é a redução da concentração plasmática de colesterol (CHIN *et al*, 1997). Também, diminui a migração e proliferação das células musculares lisas na parede arterial, provavelmente através do bloqueio das RhoA- e Rac1-, sinalizadoras celulares. Evidentes alterações na resposta inflamatória têm sido relatadas com o uso das estatinas, incluindo a inibição das citocinas, proteína-C reativa, expressão das metaloproteinases da matriz e diminuição na adesão de monócitos na célula endotelial. Estudos recentes, relativos às propriedades pleiotrópicas das estatinas, têm revelado sua capacidade de inibir a síntese de importantes intermediários dos isoprenoídes, que servem como ligações para uma variedade de proteínas implicadas na sinalização intracelular. De outro lado, estudos bem conduzidos têm revelado uma diferença na potência de ação das estatinas em reduzir o colesterol e as LDL plasmáticas, discutindo-se ainda um diferencial nos seus efeitos pleiotrópicos e uma suposta seletividade tissular (JORGE *et al*, 2005).

#### **2.2. *Pythium insidiosum***

### 2.2.1. Histórico

As manifestações clínicas da infecção por *P. insidiosum* foram primeiramente reconhecidas em meados do século XIX por veterinários britânicos na Índia, que observaram uma doença granulomatosa crônica cutânea de cavalos que eles denominaram de “bursattee”. Em fins do século XIX, uma etiologia fúngica foi proposta para a doença por vários pesquisadores com base em achados histológicos (SMITH, 1884 apud GROOTERS, 2003, p. 696; DROUIN, 1896, apud GROOTERS, 2003, p. 696). Embora o patógeno tenha sido isolado logo em 1901 pelos pesquisadores holandeses Haan & Hoogkamer que trabalhavam com eqüinos na Indonésia, a esporulação não foi induzida, e, portanto, foi assumido ser um fungo “zigomiceto” ou “ficomiceto”, baseado nas características morfológicas das suas hifas vegetativas. Somente em 1961 o agente foi identificado, recebendo o nome de *Hyphomyces destruens* (BRIDGES & EMMONS, 1961). Em 1974, AUSTWICK & COPLAND verificaram a capacidade desse agente em produzir zoósporos biflagelados, permitindo classificá-lo como um fungo da família *Pythiaceae*, ordem *Peronosporales* que deveria ser incluído no gênero *Pythium*. No entanto, a denominação *Hyphomyces destruens* continuou sendo utilizada nas descrições da doença (McMULLAN *et al.*, 1977; MURRAY *et al.*, 1978). Em 1980, ICHITANI & AMEMIYA compararam as características reprodutivas de diferentes espécies de *Pythium* e classificaram um isolado de eqüino como *Pythium gracile*. Em 1987, DE COCK *et al.* analisaram isolados de eqüinos, bovinos, cães e humanos e concluíram que se tratava do mesmo organismo, o qual foi denominado *P. insidiosum* e que essa nova espécie era igual às anteriormente descritas (*Pythium sp.* -AUSTWICK & COPLAND; *P. gracile* – ICHITANI & AMEMIYA; e *H. destruens* – BRIDGES & EMMONS). Também em 1987, SHIPTON analisou um isolado de eqüino da Austrália e classificou-o como uma nova espécie: *Pythium destruens*. A nomenclatura *P. insidiosum* foi definitivamente estabelecida em 1989, quando MENDOZA & MARIN demonstraram que os isolados *P. insidiosum* (DE COCK) e *P. destruens* (SHIPTON) apresentavam o mesmo perfil antigênico. Embora o nome do agente tenha sido estabelecido, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes. Segundo DE COCK *et al.* (1987), os Oomicetos são seres eucariotas produtores de zoósporos biflagelos, característica comum ao *P. insidiosum*, incluindo-o na ordem *Peronosporales*, filo *Oomycota* e reino *Protista*. MENDOZA *et al.* (1996), apresentaram o *P. insidiosum* como um organismo do reino *Chromista*, filo

*Pseudo-fungi*, classe *Oomycetes*, ordem *Pythiales*, e família *Pythiaceae*. Entretanto, estudos detalhados sobre a classificação dos fungos dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: *Fungi*, *Stramenopila* e *Protista* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Baseado nessa classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao reino *Stramenopila*, filo *Oomycota*, família *Pythiaceae*, gênero *Pythium* e espécie *P. insidiosum*.

### 2.2.2 Taxonomia

Os membros do gênero *Pythium* são organismos habitantes da água ou solo que pertencem ao Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae. Mais de 200 espécies de *Pythium* já foram descritas e, apesar de muitas espécies serem patógenos de plantas economicamente importantes, *P. insidiosum* é o único patógeno de mamíferos reconhecido neste gênero (RIVIERRE *et al.*, 2005). Estudos de relação filogenética entre organismos vivos, utilizando a comparação na seqüência de ácidos nucléicos da subunidade do RNA ribossomal (RNAr), demonstraram que os microrganismos pertencentes ao filo *Oomycota* estavam filogeneticamente distantes dos membros do Reino *Fungi* e mais proximamente relacionados às algas (KWON-CHUNG, 1994). A distância taxonômica entre oomycetos e fungos ocorre a nível celular, devido a diferenças na composição da membrana e parede celular. Um componente essencial da parede celular fúngica, quitina, geralmente está ausente em oomicetos, que em vez disso possuem predominantemente celulose e  $\beta$ -glucanas. Além disso, os oomicetos diferem dos fungos verdadeiros, pois não possuem ergosterol como principal esterol da membrana celular. Contudo, nem todos os oomicetos compartilham a mesma bioquímica dos esteróis. Na verdade, os oomicetos consistem de dois grupos básicos de microrganismos; àqueles que são capazes de sintetizar esteróis a partir do mevalonato e àqueles que não podem sintetizar esteróis, como é o caso da maioria das espécies patogênicas para plantas, incluindo *P. insidiosum* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). HENDRIX (1970) observou que em espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium* e *Phytophthora*, os esteróis do ambiente eram incorporados à membrana, ao invés de serem sintetizados como ocorre com os fungos verdadeiros. Em geral, esses esteróis são requeridos para a produção *in vitro* de estruturas reprodutivas, mas não necessariamente para o crescimento das hifas vegetativas (GROOTERS, 2003).

A classificação dos oomicetos é baseada geralmente nas características morfológicas de suas estruturas reprodutivas sexuais (oogonia e anterídio) e, em menor grau, através de suas estruturas reprodutivas assexuais (zoósporos). Durante muito tempo *P. insidiosum* foi tido como o único organismo zoospórico patógeno de mamíferos e, devido a isso, alguns autores sugeriram de forma equívoca que a produção de zoósporos identificava especificamente um isolado como sendo *P. insidiosum*. Hoje se sabe que muitas características da reprodução assexuada são compartilhadas por membros dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium* e *Phytophthora*, inclusive a produção de zoósporos biflagelados móveis a partir de um zoosporângio (GROOTERS, 2003). A diferenciação entre estes gêneros e suas identificações até o nível de espécie normalmente são baseadas nas características morfológicas das estruturas de reprodução sexuada. Infelizmente, devido aos isolados de *P. insidiosum* raramente produzirem estruturas de reprodução sexuada *in vitro*, sua identificação através dos aspectos morfológicos normalmente não é possível. Como resultado, na prática clínica e na literatura veterinária, isolados que têm hifas e colônias consistentes com *P. insidiosum*, crescem bem a 37°C, e podem produzir zoósporos móveis biflagelados em meio adequado, têm-se assumido como *P. insidiosum*, dado que nenhuma outra espécie de *Pythium* tem sido reconhecida como um patógeno de mamíferos (GROOTERS, 2003).

Atualmente, as técnicas moleculares se constituem em importantes ferramentas para o diagnóstico, identificação e estudos filogenéticos de *P. insidiosum*. Neste contexto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tornou-se uma importante técnica no diagnóstico da pitiose, uma vez que permite a identificação rápida e segura de *P. insidiosum* a partir de cultivos ou tecidos infectados (PEREIRA, 2008).

### **2.3. Pitiose**

Pitiose é uma doença piogranulomatosa crônica causada pelo oomiceto aquático *P. insidiosum*, que acomete humanos e animais. A espécie equina é a mais atingida, principalmente nas formas clínicas cutânea e subcutânea. Nestes animais, a doença é progressiva e caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, localizadas predominantemente, nas extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal (MILLER & CAMPBELL, 1982a; CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDOZA *et al.*, 1996). A segunda espécie mais atingida é a canina, sendo que nesta espécie as infecções por *P. insidiosum* determinam o desenvolvimento de piogranulomas



cutâneos e gastrointestinais (GROOTERS, 2003; LEBLANC *et al.*, 2008). Casos esporádicos também têm sido relatados em bovinos (SANTURIO *et al.*, 1998) e ovinos (SANTURIO *et al.*, 2008), com apresentação cutânea e subcutânea; felinos (BISSONNETTE *et al.*, 1991), com apresentação cutânea e gastrointestinal, e espécies não domésticas como jaguar (CAMUS *et al.*, 2004), urso (GROOTERS, 2003), camelo (WELLEHAN *et al.*, 2004) e maçarico (PESAVENTO *et al.*, 2008). Em humanos, é uma enfermidade de prognóstico desfavorável apresentando-se nas formas oftálmica, subcutânea e sistêmica, sendo as duas últimas associadas a  $\alpha$  e  $\beta$ -talassemias, comuns no Sudeste da Ásia (IMWIDTHAYA, 1994ab; IMWIDTHAYA, 1995).

Na espécie eqüina a pitiose caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos com a presença de massas necróticas chamadas de “kunkers” (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES *et al.*, 1993). O primeiro relato de pitiose no Brasil foi feito no Rio Grande do Sul por SANTOS & LONDERO (1974), que a descreveram como quatro casos de zigomicose eqüina. Desde então, vários relatos da doença em diferentes Estados do Brasil comprovam a existência da pitiose eqüina em todo o país (CARVALHO *et al.*, 1984; SANTOS *et al.*, 1987; MEIRELES *et al.*, 1993; TÚRY & COROA, 1997; MONTEIRO, 1999; TABOSA *et al.*, 1999; RODRIGUES & LUVIZOTTO, 2000; SANAVRIA *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2001; SALLIS *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2003; HEADLEY & ARRUDA, 2004). MENDOZA *et al.* (1996), citam que o Pantanal brasileiro é provavelmente o local de maior incidência e prevalência de pitiose eqüina do mundo. A doença é progressiva, levando o animal ao emagrecimento e à morte em 100% dos casos, mesmo o animal sendo imunocompetente. De acordo com MILLER (1981), o caráter progressivo da enfermidade sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio da mesma, pois mesmo as hifas sendo antigênicas, não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro, devido à marcante reação inflamatória. Uma vez dentro do hospedeiro, *P. insidiosum* induz a uma reação granulomatosa eosinofílica com células gigantes, mastócitos, macrófagos e poucos linfócitos. Os eosinófilos na tentativa de fagocitar o microrganismo são degranulados sobre a hifa. Em eqüinos, esta reação é extremamente pronunciada, o que leva a formação de massas firmes semelhantes a corais, conhecidas como “kunkers”, compostas por eosinófilos degranulados intercalados por hifas viáveis de *P. insidiosum* (MENDOZA *et al.*, 1996). Acredita-se que essas estruturas ajudem na proteção do fungo frente às células de defesa do hospedeiro, pois o agente fica preservado dentro do material eosinofílico. Sendo assim, esta estratégia pode proteger o

patógeno do reconhecimento pelo sistema imunológico, assegurando sua presença nos tecidos infectados (MILLER, 1981; MENDOZA *et al.*, 1992; MENDOZA *et al.*, 2003).

Nos caninos a enfermidade manifesta-se com distúrbios digestivos como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia (às vezes sangüinolenta) e presença de massas nodulares, quando submetidos à palpação abdominal (MILLER *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994). Os cães afetados são, geralmente, de áreas rurais ou tiveram contato esporadicamente com locais alagados (FOIL *et al.*, 1984).

Há poucos relatos da pitiose felina na literatura, sendo que BISSONNETTE *et al.* (1991) relataram uma infecção nasal e retrobulbar, sem envolvimento de órgãos internos, cujo diagnóstico baseou-se em imunohistoquímica, sorologia e isolamento do agente. MENDOZA *et al.* (1996) mencionaram a ocorrência de novos casos de pitiose em gatos na Flórida. Também, RAKICH *et al.* (2005) descreveram dois casos de pitiose intestinal em felinos domésticos. Foram observadas grandes massas extra-luminais no intestino delgado de ambos os animais, com obstrução parcial. A cura dos felinos foi obtida após ressecção das massas e anastomose do intestino. O diagnóstico foi realizado por sorologia e imunoperoxidase.

Nos bovinos, estão descritos apenas três casos na literatura. O primeiro nos EUA (MILLER *et al.*, 1985), o segundo no Pantanal Sul-Matogrossense (SANTURIO *et al.*, 1998) e, recentemente, na Venezuela, onde se observou a ocorrência de pitiose enzoótica em 63 bovinos (PÉREZ *et al.*, 2005). Todos os relatos referem-se a lesões cutâneas, nos membros, caracterizadas por ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada. Prurido e claudicação foram observados nos casos descritos por PÉREZ *et al.* (2005).

Até hoje existem duas descrições de pitiose ovina na literatura. No relato de TABOSA *et al.* (2004), dois rebanhos foram afetados no nordeste brasileiro, no estado da Paraíba. Em um dos surtos, 40 animais de um rebanho de 120 ovinos deslanados apresentaram a doença, onde já haviam morrido 36 animais de diferentes idades. O segundo surto afetou 6 ovinos de um rebanho de 80 animais. Os animais afetados apresentaram lesões ulcerativas úmidas ou secas, localizadas nos membros, região ventral do abdômen e região pré-escapular, sem presença de “kunkers”. Foram observadas metástases para o pulmão, linfonodo pré-escapular e osso sesamóide. Recentemente, SANTURIO *et al.* (2008) descreveram rinite granulomatosa causada por *P. insidiosum* em quatro ovinos da raça Santa Inês oriundos de áreas pantanosas do Cerrado brasileiro. A enfermidade ocorreu no período de julho a setembro apresentando curso clínico de 28 a 50

dias. As lesões clínicas caracterizaram-se pelo aumento de volume nasal, epistaxe e presença de fístulas que drenavam exsudato mucopurulento. Na necropsia, havia a presença de áreas multifocais de necrose e osteólise na região frontal do nariz e palato duro.

Em humanos, a doença apresenta-se nas formas oftálmica, subcutânea e sistêmica, sendo as duas últimas associadas a  $\alpha$  e  $\beta$ -talassemias, comuns no Sudeste da Ásia (IMWIDTHAYA, 1994ab; IMWIDTHAYA, 1995). A maioria dos casos de pitiose humana foi observada na Tailândia; e esporadicamente nos EUA, Austrália, Haiti e Nova Zelândia. No Brasil, a pitiose humana não havia sido relatada até 2005, quando BOSCO *et al.*, descreveram o primeiro caso de pitiose humana em um indivíduo de 49 anos. O paciente desenvolveu uma lesão subcutânea na perna esquerda uma semana após ter permanecido em contato com água estagnada em um lago. A forma cutânea caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões subcutâneas em pacientes talassêmicos, com achados patológicos de reação granulomatosa, infiltração difusa e edema da parede dos vasos. Já a forma arterial (sistêmica), é caracterizada pelo desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores. Esta forma é somente encontrada em pacientes talassêmicos e geralmente leva a amputação do membro afetado. A forma ocular manifesta-se como ceratite, podendo ou não estar associada à talassemia. Nesta forma, os pacientes normalmente terminam por realizar ceratoplastia, evisceração ou enucleação (IMWIDTHAYA, 1995; PRASERTWITAYAKIJ *et al.*, 2003). PRASERTWITAYAKIJ *et al.* (2003) realizaram uma extensa revisão dos casos de pitiose humana descritos na literatura, incluindo todos os principais relatos. Encontraram descritos 32 casos, sendo 25 relatados na Tailândia e os demais nos EUA, Austrália, Haiti, Malásia e Nova Zelândia. Vinte pacientes de 21 com ocupação conhecida eram fazendeiros e 23 indivíduos de 28 eram talassêmicos. Nove pacientes desenvolveram a forma de ceratite com ulceração da córnea, sendo realizada ceratoplastia em todos os afetados. Cinco apresentaram a forma subcutânea e foram submetidos à excisão cirúrgica da lesão e tratamento com antifúngicos, respondendo bem à terapia. Dezesete pacientes desenvolveram a forma sistêmica, sendo todos provenientes da Tailândia. Destes, 16 sofreram amputação do membro afetado e 8 evoluíram ao óbito. A evolução desses casos demonstra a gravidade da pitiose arterial em humanos. Na Tailândia, observa-se que dois fatores contribuem para importância da pitiose humana: a prevalência da  $\alpha$  e  $\beta$ -talassemia e presença de grandes áreas alagadiças utilizadas para agricultura (TRISCOTT *et al.*, 1993; IMWIDTHAYA, 1994b). Além dos casos de ceratite incluídos na revisão de

PRASERTWITAYAKIJ *et al.* (2003), outros relatos foram descritos na Tailândia por IMWIDTHAYA (1995) e KRAJAEJUN *et al.* (2004). MENDOZA *et al.* (2004) ao realizarem uma revisão de casos de ceratite em crianças nos EUA, no período de 1900-1987, encontraram que 5 casos descritos como ceratite fúngica, foram consistentes com lesões causadas por *P. insidiosum*. Somado aos casos descritos, HEALTH *et al.* (2002) relataram um caso de pleuropericardite causada por *P. insidiosum* em um menino portador de leucemia mielóide. KRAJAEJUN *et al.* (2006) realizaram um estudo retrospectivo para observar as características clínicas e epidemiológicas da pitiose humana, analisando dados clínicos de pacientes com pitiose diagnosticados durante o período de janeiro de 1985 a junho de 2003 em todo o território Tailandês. Um total de 102 casos de pitiose humana foi documentado, sendo que 40% destes casos ocorreram nos últimos 4 anos do estudo. As apresentações clínicas foram divididas em 4 grupos: casos cutâneos e subcutâneos (5% dos casos), casos vasculares (59%), casos oculares (33%) e casos disseminados (3%). Quase todos os pacientes com pitiose cutânea/subcutânea, vascular e disseminada (85%) eram talassêmicos. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (71%), com idade entre 20 e 60 anos (86%), sendo que 75% relataram exercer atividades agrícolas. Altas taxas de mortalidade foram observadas. Todos os pacientes com infecção disseminada morreram; 78% dos casos de doença vascular exigiram amputação e 40% destes pacientes tiveram óbito.

### 2.3.1. Tratamento

O tratamento de infecções causadas pelo *P. insidiosum* em animais e humanos é complicado pelas características do agente, sobretudo a composição de sua parede celular e membrana plasmática. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede celular, enquanto o *P. insidiosum* contém celulose e  $\beta$ -glucanos. A membrana plasmática não contém esteróides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas (FOIL, 1996). Devido a essas características, as drogas antifúngicas tradicionais são ineficientes para o tratamento da pitiose (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989; FOIL, 1996).

#### 2.3.1.1 Imunoterapia

A imunoterapia surgiu como uma alternativa para o tratamento da pitiose equina quando MILLER (1981) desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do próprio agente (hifas sonicadas). O índice de eficiência obtido na imunoterapia foi de 53%; e 75% quando associado à cirurgia (MILLER, 1981; MILLER & CAMPBELL, 1982a).

MENDOZA & ALFARO (1986), baseados na técnica originalmente descrita, utilizaram o antígeno obtido do sobrenadante de culturas de *P.insidiosum*, com o objetivo de diminuir a reação no local de aplicação e induziram, desta forma, a recuperação de três animais entre os cinco tratados. MENDOZA *et al.* (1992) compararam duas vacinas para o tratamento da pitiose equina em 71 cavalos infectados. Uma vacina utilizou massa celular como antígeno e a outra utilizou um antígeno solúvel concentrado. As duas vacinas apresentaram resultado positivo em cavalos com lesões com menos de dois meses, com 60% e 70% de eficiência, respectivamente.

No Brasil, o teste de eficiência de um imunoterápico para o tratamento da pitiose equina, produzido a partir de culturas do *P. insidiosum*, baseando-se na metodologia anteriormente descrita por MILLER (1981), demonstrou índice de cura de 50% a 83,3% entre os grupos tratados (MONTEIRO, 1999). A inovação deste imunoterápico em relação aos outros protocolos de vacinas descritos por MILLER (1981) e MENDOZA *et al.* (1992), está na liofilização do imunoterápico com prazo de validade acima de 1 ano, além do processo de liberação de antígenos ocorrer a partir da massa micelial macerada ou liquidificada. Na produção deste imunoterápico (LAPEMI/UFSM<sup>2</sup>) utilizou-se um cultivo de *P. insidiosum* isolado a partir de um potro com pitiose clínica no município de Jaguari, RS, Brasil, confirmado pelo Centrabraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Holanda) e registrado sob o número CBS 101555. SHURKO *et al.* (2003) utilizaram este isolado (CBS 101555) para estudar as diferenças moleculares entre cepas de *P. insidiosum* originárias da Ásia, Austrália e Américas. O isolado CBS 101555 mostrou, nesta publicação, o mesmo perfil molecular de isolados de eqüinos da Costa Rica e Estados Unidos (SANTURIO, 2004).

Após os insucessos de tratamentos a base de anfotericina B, iodetos, cetoconazol e cirurgia, a utilização de um imunoterápico em um menino talassêmico de 14 anos de idade, infectado pelo *P. insidiosum*, induziu a cura após duas aplicações (100µl) com intervalo de 14 dias (THITITHANYANONT *et al.*, 1998).

---

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisas Micológicas/Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, RS, Brasil.

Apesar dos estudos sobre a doença e a imunoterapia, ainda não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção por *P. insidiosum*, em parte pelas diferenças entre o *P. insidiosum* e os fungos patogênicos para os mamíferos. De acordo com MILLER (1981), o caráter progressivo da doença em eqüinos imunocompetentes sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio na resposta imunológica. O possível mecanismo imunológico desencadeado na pitiose eqüina foi proposto em 1996 por MENDOZA *et al.*

Acredita-se que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia baseiam-se principalmente na resposta celular. Este fato é sustentado pelas alterações teciduais após o início da imunoterapia, com mudança de inflamação eosinofílica inicial para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T ao final da resposta. É provável que os antígenos presentes no imunógeno induzam esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais (MENDOZA *et al.*, 1996).

#### **2.4 Terapia da pitiose e atividade antifúngica de combinações de fármacos**

Na terapia da pitiose as drogas mais utilizadas até o momento foram a anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol e terbinafina além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e sódio (SANTURIO *et al.*, 2003). Os resultados obtidos com estes fármacos são controvertidos, tanto no tratamento clínico como nos testes *in vitro*. Em um estudo, os poliênicos anfotericina B, hamicina e seus análogos não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azóis fluconazol, cetoconazol e miconazol inibiram os isolados de *P. insidiosum* testados *in vitro*, com o miconazol apresentando os melhores resultados (SEKHON *et al.*, 1992). Em outro estudo de atividade, os antifúngicos anfotericina B, fluocitosina, miconazol e griseofulvina não inibiram o crescimento do microrganismo, enquanto o itraconazol apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *P. insidiosum* testado (SHENEP *et al.*, 1998). MACMULLAN *et al.* (1977) obtiveram 50% de eficiência em um tratamento associando a remoção cirúrgica e a anfotericina B; 30% quando se utilizou somente anfotericina B e 20% dos casos não responderam aos tratamentos utilizados. Alguns autores também já relataram o uso de iodeto de sódio (CHAFFIN *et al.*, 1992). Entretanto, resultados negativos também foram observados no tratamento com iodeto de potássio endovenoso, mesmo quando associado à cirurgia (MEIRELES *et al.*, 1993).

Os fitopatógenos do gênero *Pythium* são sensíveis aos inseticidas normalmente utilizados em plantas, porém estes compostos são tóxicos aos mamíferos, impossibilitando o seu uso para o tratamento da pitiose (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989). Um fungicida utilizado em plantas (Metalaxil) foi testado no tratamento da pitiose em cães, entretanto os resultados foram pouco consistentes, em parte pela toxicidade do composto (FOIL, 1996).

No caso da pitiose canina, tanto na forma cutânea como na sistêmica, nenhuma das terapias antifúngicas propostas evidenciaram resultados satisfatórios. Entre as drogas testadas destacam-se a anfotericina B, iodeto de sódio, fluocitosina e cetoconazol (ADER, 1979; DYKSTRA *et al.*, 1999; ENGLISH & FROST, 1984). A última droga testada foi o itraconazol (5mg/kg/60 dias), porém não apresentou nenhuma melhora (DYKSTRA *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos com os agentes antifúngicos têm sido variáveis, tanto *in vitro* como *in vivo*. SEKHON *et al.* (1992) observou que os poliênicos (anfotericina B, hamicina) não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azóis fluconazol, cetoconazol e miconazol inibiram o crescimento *in vitro* de isolados de *P. insidiosum*. Em outro teste, os antimicóticos anfotericina B, flucitosina, miconazol, e griseofulvina não inibiram o crescimento do microrganismo, enquanto o itraconazol apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *P. insidiosum* (SHENEP *et al.*, 1998). Nesse estudo a associação de terbinafina e itraconazol apresentou efeito sinérgico sendo utilizada com sucesso no tratamento de um menino com infecção facial. TRISCOTT *et al.* (1993) descreveram o sucesso da anfotericina B no tratamento de dois casos de infecção periorbital em humanos, contrariando os resultados obtidos nos testes *in vitro*.

Em recente estudo, ARGENTA *et al.* (2008) avaliaram a suscetibilidade de 30 isolados clínicos de *P. insidiosum* à voriconazol, itraconazol e terbinafina através da técnica de macrodiluição e *checkerboard*. A atividade combinada de terbinafina mais itraconazol ou voriconazol resultou em sinergismo contra 17% das cepas. Antagonismo não foi observado.

BARCHIESI *et al.* (1998) utilizaram a terbinafina combinada a anfotericina B, *in vitro*, e obtiveram indiferença ou sinergismo contra cepas de *Candida albicans*. Da mesma forma obtiveram sinergismo ou indiferença na combinação de terbinafina com fluconazol ou itraconazol. Em um estudo com *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, ONVEWU *et al.* (2003) demonstraram um efeito sinérgico entre terbinafina, fenpropimorph e inibidores da

calcineurina (ciclosporina A e tacrolimus). Da mesma forma esta combinação demonstrou ter efeito fungicida.

A associação de anfotericina B com rifampicina demonstrou efeito sinérgico em experimento *in vitro* frente a algumas espécies de *Candida* (BEGGS *et al.*, 1976). No caso da interação de azóis com rifampicina os resultados são muito contraditórios (TUCKER, *et al.*, 1992). TUCKER *et al.* (1992) estudaram a interação de azóis (cetoconazol, itraconazol e/ou fluconazol) e rifampicina no tratamento de micoses sistêmicas em doze pacientes, obtendo resultados contraditórios. Também obtiveram uma redução na concentração inibitória mínima (CIM) do itraconazol, quando este foi associado à rifampicina em testes *in vitro*.

SCOTT *et al.* (1995) obtiveram um efeito sinérgico na associação de fluconazol e ibuprofen em três de quatro isolados clínicos de *Candida albicans*, provenientes de pacientes HIV positivos, indicando uma atividade antifúngica do ibuprofen, aumentada em combinação com o fluconazol. Já ARAI *et al.* (2005) não observaram nenhum efeito sinérgico destas duas drogas combinadas contra cepas de *C.albicans* suscetíveis ao fluconazol. Entretanto, quando esta associação foi testada contra cepas resistentes ao fluconazol, marcante efeito sinérgico foi detectado.

LEE *et al.* (2005) investigaram a atividade antifúngica e antioomicetos *in vitro* e *in vivo* de antibióticos aminoglicosídeos contra fungos verdadeiros e espécies de *Phytophthora* e *Pythium*, obtendo bons resultados tanto nos testes *in vitro* como nos testes *in vivo*.

Notavelmente, combinações de voriconazol e terbinafina com ou sem debridamento cirúrgico, resultaram em cura ou controle de infecções profundas causadas por *Scedosporium prolificans* (GOSBELL *et al.*, 2003; HOWDEN *et al.*, 2003). Esta espécie é resistente a todos os agentes antifúngicos disponíveis atualmente, e infecções disseminadas são quase sempre fatais (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 1999).

Em um estudo envolvendo anfotericina B e metronidazol CURY & HIRSCHFELD (1997) descreveram interações sinérgicas e aditivas. Fluvastatina foi usada combinada ao fluconazol ou itraconazol contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*, sendo que efeitos sinérgicos e aditivos foram relatados, com índices de concentração inibitória fracionária (ICIFs) variando de =0,156 a 0,625 (CHIN *et al.*, 1997).

### **3. METODOLOGIA**



### **3.1. Local do experimento**

As avaliações foram desenvolvidas nas dependências do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

### **3.2. Isolados de *P. insidiosum***

Foram utilizados 15 isolados clínicos brasileiros de *P. insidiosum* obtidos de equinos com pitiose e duas cepas padrão (ATCC 58637 e CBS 101555), totalizando 17 cepas. Todas as cepas foram mantidas em ágar fubá e a identificação das mesmas foi realizada através da indução da zoosporogênese e confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR).

### **3.3 Fármacos**

Os seguintes fármacos foram utilizados no presente estudo: terbinafina (TRB, Novartis) (0,25 a 32 mg/L), acetato de caspofungina (CAS, Merck) (0,5 a 128 mg/L), nitrato de miconazol (MNZ, Labware) (0,25 a 32 mg/L), cetoconazol (KTC, Janssen) (0,125 a 64 mg/L), fluconazol (FLC, Pfizer) (0,125 a 64 mg/L), anfotericina B (AMB, Bristol Myers Squibb) (0,25 a 16 mg/L), metronidazol (MTZ, Labware) (0,25 a 128 mg/L), ibuprofeno (IBP, Labware) (8 a 2.048), rifampicina (RIF, Aventis) (0,25 a 64 mg/L) e fluvastatina (FVN, Novartis) (0,125 a 64 mg/L). As soluções estoque dos fármacos foram preparadas de acordo com a solubilidade: exceto rifampicina, fluvastatina e fluconazol, que foram diluídas em água destilada estéril, todos os demais fármacos foram diluídos em dimetilsulfóxido.

A partir das soluções estoque dos fármacos foram realizadas diluições em série em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, a fim de obter as concentrações desejadas de cada fármaco. Todas estas diluições foram realizadas com água destilada estéril.

### **3.4. Avaliação da atividade antifúngica**

Para a avaliação da suscetibilidade dos isolados de *P. insidiosum* utilizou-se a

técnica de microdiluição em caldo seguindo o protocolo internacional M38 – A, para fungos filamentosos, determinado pelo NCCLS (*National Commitee for Clinical Laboratory Standards*), adaptado para *P. insidiosum* (PEREIRA *et al.*, 2008). Para verificar a interação entre os fármacos utilizou-se a técnica de *chequerboard* (LEWIS *et al.*, 2002). Foram realizadas as associações de terbinafina com caspofungina, anfotericina B, miconazol, cetoconazol, fluconazol, fluvastatina, metronidazol, ibuprofeno e rifampicina.

### 3.4.1. Preparação do inóculo

O inóculo utilizado consistiu de zoósporos de *P. insidiosum*, obtidos por meio do processo de zoosporogênese.

#### 3.4.1.1. Zoosporogênese

As amostras de *P. insidiosum* previamente cultivadas em CMA<sup>3</sup> foram repicadas para placas de petri contendo o mesmo meio de cultivo, juntamente com fragmentos de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. As placas foram incubadas por um período de 5 dias a temperatura de 37°C. Após esse período de cultivo, os fragmentos de grama parasitados pelo *P. insidiosum* foram transferidos para uma placa de petri contendo 30 mL de Meio de Indução, composto pela solução A [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 500 mL de água destilada estéril] e solução B [MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> em 250 mL de água destilada estéril]. O meio de indução foi formado por 0,5 mL da solução A e 0,1 mL da solução B em 1000 mL de água destilada estéril. As placas de petri contendo o Meio de Indução, juntamente com os fragmentos de grama infectados, foram incubadas a 37°C por 8 horas. Durante esse período, os fragmentos de grama foram regularmente observados, em intervalos de 1 hora, através de microscopia ótica (100 e 400 X) entre lâmina e lamínula. Após observação da formação de zoosporângios e liberação dos zoósporos, realizou-se a contagem de zoósporos livres no Meio de Indução, utilizando-se câmara de Neubauer<sup>4</sup>. O inóculo utilizado continha cerca de 30.000 zoósporos/mL (PEREIRA *et al.*, 2008).

### 3.4.2. Testes de Susceptibilidade

---

<sup>3</sup> Corn Meal Agar. Becton Dickinson.

<sup>4</sup> Improved

O inóculo final utilizado nos ensaios consistiu de 1 mL do meio de indução contendo cerca de 30.000 zoósporos/mL acrescido de 9 mL de meio RPMI<sup>5</sup> 1640 com L-glutamina, glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de MOPS<sup>6</sup> (ácido morfolínico propanosulfônico), resultando em um inóculo com aproximadamente 3.000 zoósporos/mL. Os testes foram realizados em microplaca de 96 cavidades. Foram utilizadas as mesmas concentrações dos fármacos nos testes individuais e nas combinações. Todos os testes foram feitos em duplicata, sendo que quando os resultados não coincidiram, os mesmos foram repetidos.

#### 3.4.2.1 Testes individuais

Nos testes individuais, utilizou-se somente um fármaco frente ao inóculo de *P. insidiosum*. Foram colocadas alíquotas de 100µl das diferentes concentrações de cada fármaco (a partir de soluções 2x concentradas) nas cavidades da microplaca; um volume igual de inóculo foi adicionado a cada cavidade, resultando em uma concentração final de cerca de 1.500 zoósporos/mL. Para cada isolado de *P. insidiosum* testado foram realizados controles positivos (somente 200µl de inóculo) e negativos (somente 200µl de RPMI). As microplacas foram incubadas em estufa com temperatura controlada, a 37°C, durante 24 horas. Depois deste período foi realizada a leitura dos testes, visualizando a concentração inibitória mínima (CIM) de cada fármaco, considerando-se a menor concentração onde não houve crescimento de hifas.

De posse das CIMs de cada fármaco contra cada uma das cepas estudadas, determinou-se ainda a CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> (concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento de 50 e 90% das cepas, respectivamente).

#### 3.4.2.2 Testes de Susceptibilidade com associações e fármacos (*checkerboard*)

Para as associações, alíquotas de 50µl de cada droga (provenientes de soluções de fármaco 4x concentradas) eram dispensadas nas cavidades da microplaca; em seguida era adicionado 100µl do inóculo a cada cavidade, resultando em um volume final de 200µl, corrigindo-se o inóculo e os fármacos para as concentrações desejadas. As microplacas eram incubadas a 37°C/24horas e após realizava-se visualmente a leitura, determinando-se

---

<sup>5</sup> Gibco Laboratories

<sup>6</sup> Acros

a concentração inibitória mínima de cada associação.

A partir das CIMs obtidas nos testes individuais e das CIMs obtidas nas associações realizou-se a análise das interações entre os fármacos, baseada nos respectivos índices de concentração inibitória fracionária (ICIFs). Os ICIFs foram obtidos através da seguinte fórmula:  $ICIF = (CIM\ A\ na\ associação / CIM\ A) + (CIM\ B\ na\ associação / CIM\ B)$ . As interações foram interpretadas como sinérgicas ( $ICIF = 0,5$ ), indiferentes ( $ICIF > 0,5$  e  $= 4$ ) ou antagônicas ( $ICIF > 4$ ). (JOHNSON, 2004)

## **CAPÍTULO 1**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE TERBINAFINA ASSOCIADA À CASPOFUNGINA E  
ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS CONTRA ISOLADOS DE *Pythium insidiosum*.**

## ARTIGO 1

***In Vitro* Activity of Terbinafine Associated to Caspofungin and Azoles Against  
*Pythium insidiosum*.**

**Artigo submetido ao *Antimicrobial Agents and Chemotherapy***

**Title:** In Vitro Activity of Terbinafine Associated to Caspofungin and Azoles Against *Pythium insidiosum*.

**Authors:** Ayrton S. Cavalheiro <sup>a</sup>, Grazieli Maboni <sup>d</sup>, Maria I. de Azevedo <sup>d</sup>, Juliana S. Argenta <sup>bd</sup>, Daniela I. B. Pereira <sup>d</sup>, Tatiana B. Spader <sup>cd</sup>, Sydney H. Alves <sup>cd</sup>, Janio M. Santurio <sup>ad\*</sup>

**Affiliations:** <sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Micologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>d</sup> Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

\* **Corresponding author:** Prof Dr Janio Morais Santurio, Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Phone/Fax: +55 55 32208906. E-mail: santurio@smail.ufsm.br

**Short title:** In vitro activity of drugs against *Pythium insidiosum*.

**Key words:** susceptibility tests, *pythiosis*, broth microdilution, combination therapy, zoospores.

## ABSTRACT

*Objectives:* evaluate *in vitro* antifungal activities of terbinafine combined with caspofungin, miconazole, ketoconazole and fluconazole against *Pythium insidiosum*.

*Methods:* Seventeen *P. insidiosum* strains were tested against a range of concentrations of terbinafine (0.25 to 32 mg/L), caspofungin (0.5 to 128 mg/L), miconazole (0.25 to 32 mg/L), ketoconazole (0.125 to 64 mg/L) and fluconazole (0.125 to 64 mg/L) with a microdilution chequerboard method based on the CLSI M38-A reference method and the combinations effects were analysed by the fractional inhibitory concentration index (FICI).

*Results:* Synergisms were observed by terbinafine combined with caspofungin (41.18%), fluconazole (41.18%), ketoconazole (29.41%) and miconazole (11.76% of the strains). Antagonisms were not observed.

*Conclusions:* The combinations of terbinafine plus caspofungin or terbinafine plus fluconazole may have significant therapeutic potential for treatment of pythiosis.



## INTRODUCTION

Pythiosis is an emerging and life-threatening infectious disease in humans and animals which is caused by an aquatic oomycete *Pythium insidiosum*.<sup>1</sup> Horses are mostly affected, showing ulcerative granulomatous lesions that develop for large masses of tissue edges irregulars and tumor appearance, mainly in the lower portion of the extremities or ventral portion of the abdomen, regions affected due to often contact with aquatic environments where *P. insidiosum* occurs.<sup>2</sup> In humans, the infection presents as ophthalmic, subcutaneous and systemic forms, frequently associated with  $\alpha$  and  $\beta$ -thalassemia, common in Asia South East.<sup>3</sup> Therapies used so far have shown ineffective or at least controversial results, establishing an unfavorable prognosis for human and horses pythiosis.<sup>4</sup> The currently available antifungal drugs alone such as amphotericin B and azoles have shown neither appreciable nor safe therapeutic activity against *P. insidiosum*.<sup>5</sup> Therefore, surgical removal of the infection site, such as amputation, has been considered an effective treatment for vascular pythiosis. However, such radical surgery leads to permanent morbidity and moreover has exhibited a high rate of recurrence.<sup>6</sup>

Thus, the development of new antifungal agents with different mechanisms of action has stimulated renewed interest in the combination of antifungal therapy.<sup>7</sup>

The purpose of this study was to investigate the *in vitro* activity of terbinafine associated to caspofungin, miconazole, ketoconazole and to fluconazole against seventeen strains of *Pythium insidiosum* isolated from animals.

## MATERIALS AND METHODS

**Antifungal agents.** Terbinafine (TRB, Novartis) (0.25 to 32 mg/L), caspofungin acetate (CAS, Merck) (0.5 to 128 mg/L), miconazole nitrate (MNZ, Labware) (0.25 to 32 mg/L), ketoconazole (KTC, Janssen) (0.125 to 64 mg/L) and fluconazole (FLC, Pfizer) (0.125 to 64 mg/L). The drug stock solutions were prepared according the solubility: except for fluconazole which was diluted in distilled sterile water, all other antifungal agents were diluted in dimethylsulfoxide.

**Organisms.** Fifteen Brazilian *P. insidiosum* strains obtained from equines with pythiosis and two standard strains (ATCC 58637 and CBS 101555) were also included. All strains were maintained in Corn Meal Agar (CMA). The identification of isolates was confirmed by PCR.

**Antifungal activities assays.** Were assayed by broth microdilution, based on protocol M38-A for filamentous fungi,<sup>8</sup> adapted to *P. insidiosum*. The inocula consisted of *P. insidiosum* zoospores obtained through process of zoosporogenesis.<sup>9</sup> They were counted in a hemocytometer and diluted in RPMI 1640 containing L-glutamine and buffered to pH 7.0 with 0.165M MOPS, yielding a final concentration of  $2 \times 10^3$  to  $3 \times 10^3$  zoospores/ml.<sup>9</sup> For each strain tested were performed positive (inoculum diluted) and negative control (only RPMI).

Associations TRB-CAS, TRB-MNZ, TRB-KTC and TRB-FLC were evaluated using the checkerboard technique according to the broth microdilution design.<sup>10</sup> The same range of drug concentrations used in individual tests was employed for the checkerboard technique. In individual tests, aliquots of 100µl of different concentrations of each drug were placed in cavities of microplate; an equal volume of inoculum was added to each well. In the combinations tests the antimicrobial agents were employed 4x concentrate

because the volumes dispensed were 50µl (drug A) plus 50µl (drug B). The addition of 100µl of the inoculum suspension the concentrations were corrected. The microplates were incubated at 37°C/24h in order to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs). MICs were defined as the lowest drug concentration at which there was 100% of inhibition of fungal growth by visual readings. The tests were carried out in duplicate. Whenever the values obtained were not coincident the assay was repeated. The interactions, based on the respective FICI (fractional inhibitory concentration index), were interpreted as: FICI = 0.5 = synergistic, FICI > 0.5 to = 4 = no interaction or FICI > 4 = antagonistic. FICIs were obtained by the following formula:  $FICI = (MIC\ A\ in\ combination / MIC\ A) + (MIC\ B\ in\ combination / MIC\ B)$ .

## RESULTS

Table 1 shows the *in vitro* activities of individual antifungal agents against *P. insidiosum* taking account MIC ranges, GM (geometric mean), MIC50 and MIC90 (minimum inhibitory concentration able to inhibit 50% and 90% of the isolates, respectively).

Based on GM the best antifungal activity was obtained by miconazole, emphasizing that 70.6% of the isolates have shown MICs = 16 mg/L. Based on MIC50 terbinafine was more active because 82.03% of strains showed MICs = 16 mg/L. However the parameters of susceptibility showed for individual drugs a weak or absent antifungal activities for all agents tested.

The activities of drug combinations are showed in Table 2 considering MICs of drugs in combination, FICIs and its interpretation.

Both the combinations terbinafine plus fluconazole (TRB-FLC) and terbinafine plus caspofungin (TRB-CAS) showed synergisms for seven (41.18%) *P. insidiosum* strains. Terbinafine plus ketoconazole was synergistic for 5 (29.41%) isolates and the combination terbinafine plus miconazole (TRB-MNZ) showed synergisms for only two (11.76%) isolates. Antagonisms were not observed in none antimycotics combinations studied.

## **DISCUSSION**

Combination therapy could be an alternative to monotherapy for patients with invasive infections due to resistant microorganisms which show failure to standard treatments.<sup>10</sup>

Regarding to pythiosis which is difficult to treat and can be a life-threatening infections for human and horses, the possibilities of a potent antifungal effect obtained by combined therapy require investigation. In this work we have studied the *in vitro* activities of selected antifungal agents combined against *P. insidiosum* because there are few studies showing the susceptibility of this oomycete to individual and associations of antimycotics.

Our results regarding to individual activity of antifungal agents are difficult to well interpret because are few previous susceptibilities studies with *P. insidiosum* and those reported were carried out through different technical conditions as macrodilution or did not refer the methodology employed.<sup>11,12</sup> In addition, the breakpoints for susceptibility tests with antifungal agents are well defined only for fluconazole, itraconazole, voriconazole, and flucytosine against *Candida* species.<sup>13</sup> By the way, the susceptibilities tests performed suggest the weak antifungal activity of the selected agents, what is in accordance with well known therapeutic failures in pythiosis treatment. In contrast, the

results obtained by drugs combination which are based on FICIs, can be interpreted with more confidence.

Studies focusing combined drugs against *P. insidiosum* are almost inexistent; recently Argenta *et al.*<sup>11</sup> have reported that the combination terbinafine plus itraconazole or voriconazole resulted in synergism against 17% of the strains, and antagonisms were not observed. The first report of synergistic effect by terbinafine plus itraconazole was by Shenep *et al.*<sup>12</sup> obtaining successful medical therapy for deeply invasive facial infections due to *P. insidiosum* in a child.

Here we showed significant synergisms: the combinations terbinafine plus fluconazole and terbinafine plus caspofungin were synergistic for 41.18% of *P. insidiosum* strains. The synergisms by terbinafine plus ketoconazole (29.4%) and terbinafine plus miconazole (11.76%) also deserves attention. To our knowledge these synergisms against *P. insidiosum* are being here reported by the first time. Our results did not demonstrate any antagonism among the combinations studied.

Another important fact that require note, was the great susceptibility variations among *P. insidiosum* strains. Based on the number of synergistic effects regarding to each strain, our study showed that 64.69% of strains were indifferent for all or susceptible to only one antifungal agent combination. On contrary, only one strain was susceptible for all combinations (see table 2). In our opinion these findings reflect the complexity of *P. insidiosum* biology which we suppose are related with genetic variability; molecular studies have already pointed this problem which might require new strategies for treatments.<sup>14</sup>

Despite these insolvable aspects, our *in vitro* findings show that antifungal agents in combination may be alternatives which must be experimentally explored by *in vivo*

studies in order to confirm the potential therapeutic of the synergisms against *P. insidiosum*.

### **FUNDING**

This study was supported by CNPq (the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil) and by Laboratório de Pesquisas Micológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

### **TRANSPARENCY DECLARATIONS**

None to declare.

## REFERENCES

1. Mendoza L, Ajello L. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med* 1996; **6**: 151–64.
2. Leal ABM, Leal AT, Santurio JM *et al.* Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. *Pesq Vet Bras* 2001; **21**: 151-56.
3. Imwidthaya P. Human pythiosis in Thailand. *Postgrad Med J* 1994b; **70**: 558-60.
4. Thianprasit M. Human pythiosis. *Top Dermatol* 1990; **4**:1–4.
5. Sekhon AS, Padhye AA, Garg AK. *In vitro* sensitivity of *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. *Eur J Epidemiol* 1992; **8**: 427–32.
6. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R *et al.* Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 569-76.
7. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L *et al.* Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 693–715.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi - Approved standard M38-A*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
9. 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.
10. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy: what value are they? *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 854–69.
11. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH *et al.* *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 767-69.

12. 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**: 1388–93.
  
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast - Second edition: Approved standard M27-A2*. NCCLS, Pennsylvania, USA, 2002.
  
14. Schurko AM, Mendoza L, De Cock AWAM *et al.* Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored. *Mycologia* 2003; **95**: 200-08.



Table 1. *In vitro* activity of terbinafine, caspofungin and azoles against isolated from *Pythium insidiosum* (mg/L).\*

<b>Drugs</b>	<b>MIC range<sup>a</sup></b>	<b>GM<sup>b</sup></b>	<b>MIC 50<sup>c</sup></b>	<b>MIC 90<sup>d</sup></b>
Terbinafine	8 - 32	14.7	16	32
Caspofungin	8 - 64	19.6	16	64
Miconazole	4 - 32	13.6	16	32
Ketoconazole	16 - 64	23.1	32	64
Fluconazole	32 - 64	59.0	64	64

\* n=17

<sup>a</sup> That is, range between the lower and higher minimum inhibitory concentration for all isolated.

<sup>b</sup> That is, Geometric Means of MICs.

<sup>c</sup> That is, minimum inhibitory concentration of drug capable of inhibiting the growth of 50% of isolates.

<sup>d</sup> That is, minimum inhibitory concentration of drug capable of inhibiting the growth of 90% of isolates.

Table 2. *In vitro* activity of terbinafine plus fluconazole, miconazole, ketoconazole and caspofungin against *Pythium insidiosum*.\*

Isolate <sup>a</sup>	Terbinafine and Fluconazole			Terbinafine and Miconazole			Terbinafine and Ketoconazole			Terbinafine and Caspofungin		
	MIC of combination (mg/liter)			MIC of combination (mg/liter)			MIC of combination (mg/liter)			MIC of combination (mg/liter)		
	TRB	FLC	FICI (interpret.) <sup>b</sup>	TRB	MNZ	FICI (interpret.)	TRB	KTC	FICI (interpret.)	TRB	CAS	FICI (interpret.)
LAPEMI 119	4	0.125	0.2 (S)	4	0.5	0.3 (S)	4	0.125	0.3 (S)	0.5	1	0.1 (S)
LAPEMI 123	8	0.125	1.0 (NI)	0.25	16	0.6 (NI)	0.25	16	1.0 (NI)	0.25	8	0.6 (NI)
LAPEMI 124	32	64	2.0 (NI)	1	16	1.0 (NI)	0.25	1	0.5 (S)	0.25	16	0.5 (S)
LAPEMI 125	32	64	2.0 (NI)	32	32	2.0 (NI)	32	32	2.0 (NI)	4	16	0.6 (NI)
LAPEMI 126	4	0.125	0.5 (S)	0.25	16	1.0 (NI)	4	8	0.6 (NI)	0.25	8	0.6 (NI)
LAPEMI 128	16	0.125	1.0 (NI)	0.25	16	1.0 (NI)	0.25	8	1.0 (NI)	0.25	32	0.2 (S)
LAPEMI 129	8	0.125	1.0 (NI)	1	32	1.1 (NI)	4	8	0.6 (NI)	0.25	8	0.6 (NI)
LAPEMI 130	8	4	0.3 (S)	0.25	16	2.0 (NI)	0.25	4	0.5 (S)	0.25	8	0.5 (S)
LAPEMI 135	8	0.125	0.5 (S)	0.25	0.25	0.1 (S)	0.25	16	0.6 (NI)	0.25	8	0.6 (NI)
LAPEMI 136	8	4	0.6 (NI)	0.25	16	1.0 (NI)	0.25	0.5	0.1 (S)	0.25	4	0.2 (S)
LAPEMI 138	32	0.125	2.0 (NI)	4	8	1.2 (NI)	8	4	0.6 (NI)	0.25	16	0.6 (NI)
LAPEMI 144	4	0.125	0.5 (S)	0.25	16	1.0 (NI)	4	8	0.6 (NI)	1	4	1.1 (NI)
LAPEMI 147	32	0.125	2.0 (NI)	16	0.25	1.0 (NI)	32	0.125	2.0 (NI)	0.25	16	1.0 (NI)
LAPEMI 148	16	16	2.0 (NI)	0.25	8	0.6 (NI)	0.25	16	1.0 (NI)	0.25	0.5	0.1 (S)
LAPEMI 187	4	0.125	0.5 (S)	4	0.25	0.6 (NI)	4	0.125	0.5 (S)	4	0.5	0.5 (S)
ATCC 58637	8	8	0.7 (NI)	0.25	8	1.0 (NI)	0.25	16	1.0 (NI)	0.25	4	1.0 (NI)
CBS 101555	8	0.125	0.5 (S)	0.25	8	2.0 (NI)	4	16	0.7 (NI)	1	8	0.6 (NI)

\* n=17. <sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures. <sup>b</sup> Interpretations: S, synergistic; NI, no interaction.

## TABELAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO 1 (NÃO PUBLICADAS)

Tabela 1 - Atividade *in vitro* da terbinafina e fluconazol, individualmente e em associação, contra isolados de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação
	Terbinafina	Fluconazol	Terbinafina	Fluconazol	
LAPEMI 119	16	64	4	0,125	0,2 sinergismo
LAPEMI 123	8	64	8	0,125	1,0 indiferença
LAPEMI 124	32	64	32	64	2,0 indiferença
LAPEMI 125	32	64	32	64	2,0 indiferença
LAPEMI 126	8	64	4	0,125	0,5 sinergismo
LAPEMI 128	16	64	16	0,125	1,0 indiferença
LAPEMI 129	8	64	8	0,125	1,0 indiferença
LAPEMI 130	32	64	8	4	0,3 sinergismo
LAPEMI 135	16	64	8	0,125	0,5 sinergismo
LAPEMI 136	16	64	8	4	0,6 indiferença
LAPEMI 138	16	64	32	0,125	2,0 indiferença
LAPEMI 144	8	64	4	0,125	0,5 sinergismo
LAPEMI 147	16	64	32	0,125	2,0 indiferença
LAPEMI 148	16	32	16	16	1,5 indiferença
LAPEMI 187	8	64	4	0,125	0,5 sinergismo
ATCC 58637	16	32	8	8	0,7 indiferença
CBS 101555	16	64	8	0,125	0,5 sinergismo

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária

Tabela 2 - Atividade *in vitro* da terbinafina e miconazol, individualmente e em associação, contra isolados de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação	
	Terbinafina	Miconazol	Terbinafina	Miconazol		
LAPEMI 119	16	16	4	0,5	0,3	sinergismo
LAPEMI 123	8	32	0,25	16	0,6	indiferença
LAPEMI 124	32	16	1	16	1,0	indiferença
LAPEMI 125	32	32	32	32	2,0	indiferença
LAPEMI 126	8	16	0,25	16	1,0	indiferença
LAPEMI 128	16	16	0,25	16	1,0	indiferença
LAPEMI 129	8	32	1	32	1,1	indiferença
LAPEMI 130	32	8	0,25	16	2,0	indiferença
LAPEMI 135	16	8	0,25	0,25	0,1	sinergismo
LAPEMI 136	16	16	0,25	16	1,0	indiferença
LAPEMI 138	16	8	4	8	1,2	indiferença
LAPEMI 144	8	16	0,25	16	1,0	indiferença
LAPEMI 147	16	32	16	0,25	1,0	indiferença
LAPEMI 148	16	16	0,25	8	0,6	indiferença
LAPEMI 187	8	4	4	0,25	0,6	indiferença
ATCC 58637	16	8	0,25	8	1,0	indiferença
CBS 101555	16	4	0,25	8	2,0	indiferença

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária

Tabela 3 - Atividade *in vitro* da terbinafina e caspofungina (CAS), individualmente e em associação, contra isolados de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação	
	Terbinafina	CAS	Terbinafina	CAS		
LAPEMI 119	16	16	0,5	1	0,1	sinergismo
LAPEMI 123	8	16	0,25	8	0,6	indiferença
LAPEMI 124	32	32	0,25	16	0,5	sinergismo
LAPEMI 125	32	32	4	16	0,6	indiferença
LAPEMI 126	8	16	0,25	8	0,6	indiferença
LAPEMI 128	16	64	0,25	32	0,3	sinergismo
LAPEMI 129	8	16	0,25	8	0,6	indiferença
LAPEMI 130	32	16	0,25	8	0,5	sinergismo
LAPEMI 135	16	16	0,25	8	0,6	indiferença
LAPEMI 136	16	16	0,25	4	0,2	sinergismo
LAPEMI 138	16	32	0,25	16	0,6	indiferença
LAPEMI 144	8	8	1	4	1,1	indiferença
LAPEMI 147	16	16	0,25	16	1,0	indiferença
LAPEMI 148	16	16	0,25	0,5	0,05	sinergismo
LAPEMI 187	8	64	4	0,5	0,5	sinergismo
ATCC 58637	16	8	0,25	4	1,0	indiferença
CBS 101555	16	16	1	8	0,6	indiferença

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária

Tabela 4 - Atividade *in vitro* da terbinafina e cetoconazol, individualmente e em associação, contra isolados de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação	
	Terbinafina	Cetoconazol	Terbinafina	Cetoconazol		
LAPEMI 119	16	16	4	0,125	0,3	sinergismo
LAPEMI 123	8	16	0,25	16	1,0	indiferença
LAPEMI 124	32	16	0,25	1	0,5	sinergismo
LAPEMI 125	32	32	32	32	2,0	indiferença
LAPEMI 126	8	64	4	8	0,6	indiferença
LAPEMI 128	16	16	0,25	8	1,0	indiferença
LAPEMI 129	8	64	4	8	0,6	indiferença
LAPEMI 130	32	16	0,25	4	0,5	sinergismo
LAPEMI 135	16	32	0,25	16	0,6	indiferença
LAPEMI 136	16	64	0,25	0,5	0,02	sinergismo
LAPEMI 138	16	32	8	4	0,6	indiferença
LAPEMI 144	8	64	4	8	0,6	indiferença
LAPEMI 147	16	32	32	0,125	2,0	indiferença
LAPEMI 148	16	16	0,25	16	1,0	indiferença
LAPEMI 187	8	64	4	0,125	0,5	sinergismo
ATCC 58637	16	16	0,25	16	1,0	indiferença
CBS 101555	16	32	4	16	0,7	indiferença

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária

Tabela 5 – Atividade *in vitro* das associações de terbinafina à caspofungina, miconazol, cetoconazol e fluconazol contra isolados de *Pythium insidiosum*.

Combinação	Atividade antifúngica		
	Sinérgica % (n)	Indiferente % (n)	Antagônica % (n)
Terbinafina/Caspofungina	41,18 ( 7 )	58,82 ( 10 )	0,00 ( 0 )
Terbinafina/Miconazol	11,76 ( 2 )	88,24 ( 15 )	0,00 ( 0 )
Terbinafina/Cetoconazol	29,41 ( 5 )	70,59 ( 12 )	0,00 ( 0 )
Terbinafina/Fluconazol	41,18 ( 7 )	58,82 ( 10 )	0,00 ( 0 )

## CAPÍTULO 2

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE TERBINAFINA ASSOCIADA À ANFOTERICINA B,  
FLUVASTATINA, RIFAMPICINA, METRONIDAZOL E IBUPROFENO  
CONTRA ISOLADOS DE *Pythium insidiosum*.**



## ARTIGO 2

***In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*.**

**Artigo aceito no *Veterinary Microbiology*.**

**Title:** In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against Pythium insidiosum.

**Authors:** Ayrton S. Cavalheiro <sup>a</sup>, Régis A. Zanette <sup>b,d</sup>, Tatiana B. Spader <sup>c,d</sup>, Luciane T. Lovatto <sup>d</sup>, Franciele Bess <sup>d</sup>, Sydney H. Alves <sup>c,d</sup>, Janio M. Santurio <sup>a,d\*</sup>

**Affiliations:** <sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS, Brazil, 97105-900.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Micologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS, Brazil, 97105-900.

<sup>d</sup> Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS, Brazil, 97105-900.

\* **Corresponding author.** Prof. Dr. Janio Morais Santurio, Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Phone/Fax: +55 55 32208906. E-mail: santurio@smail.ufsm.br

## ABSTRACT

Pythiosis is a granulomatous disease of human and animals that occurs primarily in tropical and subtropical areas of the world. It is caused by an aquatic, fungus-like organism called Pythium insidiosum. The treatment for pythiosis is uncertain, with an unfavorable prognosis for human and animals. Therefore, new possibilities for treatments must be examined. Here, we have evaluated the in vitro activities of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole or ibuprofen against 17 clinical isolates of Pythium insidiosum. The assays were based on technique M38-A, as well as the checkerboard microdilution method. The main synergism observed was by combination of terbinafine plus amphotericin B (41.18%). The combination of terbinafine plus rifampicin and terbinafine plus metronidazole were indifferent for 94.12% of strains. Terbinafine plus ibuprofen was indifferent for 82.35% of strains. Antagonisms were observed in combinations of terbinafine with fluvastatin (35.30%) or rifampicin (5.88%).

**Keywords:** Pythiosis, Pythium insidiosum, fungus-like, terbinafine, broth microdilution, antifungal activity.

## 1. INTRODUCTION

Pythiosis is an emerging disease of animals and humans in the tropical, subtropical and temperate regions of the world. It is caused by Pythium insidiosum, a fungus-like aquatic organism classified in the kingdom Straminipila, phylum Oomycota (1). The genus Pythium comprises more than 200 species, some of which are among the most destructive plant pathogens. P. insidiosum, however, is the only known species of the genus that causes disease in humans and other mammals (1). The zoospore swims toward and attaches to the host, where upon it invades the tissue (2). Pythiosis progresses rapidly, leading to death for human and animal patients. Radical surgery remains the most effective treatment for this infection in humans (3). Other authors point out that immunotherapy constitutes an important alternative for the treatment of equine pythiosis, with cure rates that vary around 70-80% because antifungal therapy is scarcely effective (4).

The special oomycete's characteristic cell wall composition and the lack of ergosterol in the cytoplasmic membrane may explain the difficulties of antifungal therapy against pythiosis (5). The various attempts of treatment, in animals as well as in humans, performed with antifungal drugs such as amphotericin B, ketoconazole, miconazole, fluconazole, itraconazole and terbinafine have presented variable and sometimes contradictory results (6, 7). One approach to improving antifungal therapies has been the use of combination therapy, which may offer the benefits of using reduced doses of toxic drugs through synergy (8).

The purpose of this study was to investigate the in vitro activity of terbinafine in combination with amphotericin B, metronidazole, rifampicin, ibuprofen or fluvastatin, against 17 strains of P. insidiosum isolated from animals.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Fifteen Brazilian *P. insidiosum* strains obtained from equines with pythiosis and two standard strains (ATCC 58637 and CBS 101555) were studied. The identification of the isolates was confirmed by PCR based assay. The drugs, terbinafine (TRB, Novartis) (0.25 to 32 mg/L), amphotericin B (AMB, Bristol Myers Squibb) (0.25 to 16 mg/L), metronidazole (MTZ, Labware) (0.25 to 128 mg/L) and ibuprofen (IBP, Labware) (8 to 2,048) were diluted in dimethylsulfoxide in order to prepare the stock solutions. Rifampicin (RIF, Aventis) (0.25 to 64 mg/L) and fluvastatin (FVN, Novartis) (0.125 to 64 mg/L) were diluted in sterile distilled water. The susceptibility test was adapted for *P. insidiosum* (9) from protocol M38-A, originally for use with filamentous fungi (microdilution broth) (10). The inocula consisted of *P. insidiosum* zoospores obtained through the process of zoosporogenesis. They were counted in a hemacytometer and diluted in RPMI 1640 broth containing L-glutamine and buffered to pH 7.0 with 0.165M MOPS, yielding a final concentration of  $2 \times 10^3$  to  $3 \times 10^3$  zoospores/ml (9). For each strain tested, a positive (inoculum diluted) and negative control (only RPMI) was performed.

The combinations TRB-FVN, TRB-RIF, TRB-MTZ, TRB-IBP and TRB-AMB were evaluated by the checkerboard microdilution method (11, 8). The range of drug concentrations used in individual tests was the same for the technique of checkerboard. In individual tests, aliquots of 100µl of different concentrations of each drug were placed in the wells of a microplate and an equal volume of inoculum was added to each well. For the combinations, aliquots of 50µl of each drug, 4× concentrate, were added to the microplate wells, along with 100µl of inoculum. This results in a final volume of 200µl. The minimal inhibitory concentrations (MICs) were read after 24h of incubation at 37°C. The reading was visual and assessed the growth or absence of growth of hyphae. MICs were defined as

the lowest drug concentration at which there was 100% inhibition of fungal growth. The tests were carried out in duplicate on the same day. Whenever the values obtained were not coincident, the assay was repeated. The interactions were interpreted as synergistic (fractional inhibitory concentration index [FICI] = 0.5), indifferent ( $0.5 < \text{FICI} \leq 4$ ), or antagonistic ( $\text{FICI} > 4$ ) based on the respective FICI (12), using the following formula:  $\text{FICI} = (\text{MIC A in combination} / \text{MIC A}) + (\text{MIC B in combination} / \text{MIC B})$ . Off-scale MICs were converted to the next higher dilution for calculation purposes.

### 3. RESULTS

Table 1 shows the in vitro activity of individual drugs against *P. insidiosum*, taking into account MIC range, GM (geometric mean), MIC<sub>50</sub> (minimum inhibitory concentrations able to inhibit 50% of the strains) and MIC<sub>90</sub> (minimum inhibitory concentrations able to inhibit 90% of the strains). Based on the high MICs, the non-antifungal agents showed a weak antifungal activity against *P. insidiosum*. Only rifampicin was unable to inhibit the hyphal growth at the highest concentration assessed (64 mg/L). Terbinafine and amphotericin B showed similar MIC ranges (8.0 to 32.0 mg/L), which suggest the absence of antifungal activity for amphotericin B but weak activity for terbinafine.

The activities of drug combinations are shown in Table 2, considering MICs of drugs in combination, FICIs and its interpretation. The combination TRB-RIF was indifferent for 16 (94.12%) strains and antagonistic for one. TRB-FVN was indifferent for 11 (64.70%) strains and antagonistic for 6 (35.30%) strains. The TRB-MTZ combination was indifferent for 16 (94.12%) strains and synergistic for one. When the combination of TRB-IBP was studied, we have observed three (17.65%) synergistic effects and 14

(82.35%) indifferent effects against P. insidiosum. The association of two antifungal agents TRB-AMB showed synergism for 7 (41.18%) strains, indifference for 10 (58.82%) strains but antagonism was not noted.

#### 4. DISCUSSION

The development of new antifungal agents with different mechanisms of action, and the possible synergistic effect obtained from the combination of antifungal agents with drugs of other pharmaceutical classes, has stimulated great interest in the combination of therapies. Because pythiosis is a problematic disease to treat and can be life-threatening for humans and horses, the possibilities for new and potent antifungal effects obtained through combination therapy require investigation. This study was focused in terbinafine because previous studies have already shown that P. insidiosum can be sensitive to this antimycotic agent (13, 7). Therefore, we started by studying the in vitro activities of selected drugs already cited by others to have antifungal effects (14, 15-17, 12).

Regarding the methodology used, we emphasize that P. insidiosum zoospores can be counted, allowing for the ability to obtain a standardized inoculum. We have based this on the M38-A technique (10), which has already been standardized for filamentous fungi and is previously reported (13, 9). P. insidiosum shows excellent growth on RPMI broth. Argenta et al. (13) have employed the macrodilution methodology, also based on the M38-A technique. Due to difficulties of obtaining large amounts of zoospores, which depend on a previous zoosporogenesis in vitro process, and following the tendency to use microdilution procedures, we have employed the microdilution methodology where the final volume for each well was 200  $\mu$ L.

The individual MICs for terbinafine shown here are higher than that reported by Argenta et al. (13); we do not know the causes for this. However, while microdilution is

easier to perform and less troublesome, the readings are more difficult than that obtained by the macrodilution technique.

Except for terbinafine and amphotericin B, all other drugs have not yet been tested against P. insidiosum. Because the MICs for all non-antifungal agents alone were lower than the higher concentrations tested, we agree with previous studies that indicate they have some degree of antifungal activity (14, 16, 17, 12). On the other hand, based on our results, these non-antifungal agents combined with terbinafine were less exciting.

The combination TRB-FVN was indifferent or antagonistic for 100% of the strains. Against Candida spp and Cryptococcus neoformans, the combinations with fluconazole or itraconazole resulted in additive and synergistic effects (17). Future studies adjusting the combinations itraconazole plus fluvastatin against P. insidiosum must be evaluated.

Rifampicin combined with terbinafine was indifferent or antagonistic for 100% of the strains. Against Candida spp, the combination of amphotericin B plus rifampicin showed synergism (16). Regarding the interactions with azoles, the results with rifampicin are very contradictory (18).

Metronidazole combined with amphotericin B was reported to have synergistic and additive interactions against Candida spp (12). Here, we have noted indifference for 94.12% of the P. insidiosum strains studied.

Ibuprofen is an anti-inflammatory agent to which an antifungal activity against Candida albicans was reported when combined with fluconazole (14). Against P. insidiosum, we observed indifferent effect for 82.35% of the strains; however, synergistic effect was noted against three strains (17.65%).

Terbinafine combined with amphotericin B showed synergism for 41.18% of the strains and no antagonistic effects were observed; this was the best result of the study.



Barchiesi et al. (15) have already reported indifference or synergism for this combination against Candida spp strains. Our results are similar. The main amphotericin B mechanism of action is its interaction with the sterol in the cell membrane of the fungi, increasing permeability and allowing the casting of important molecules. Because P. insidiosum has no ergosterol in the cell membrane, another additional mechanism may be involved (19). Finally, this combination can be an interesting alternative for pythiosis treatment and future in vivo experimental study is essential.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by CNPq (the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil) and by the Laboratório de Pesquisas Micológicas of Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

## 6. REFERENCES

1. Mendoza L, Pythium insidiosum. In: Ajello L, Hay RJ, eds. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. London: Arnold, 2000.
2. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen Pythium insidiosum. J Clin Microbiol 1993;31:2967-2973.
3. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis 2006;43:569-576.
4. Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved Pythium insidiosum-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. Vaccine 2003;21:2797-2804.
5. Grooters AM. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003;33:695-720.
6. McMullan WC, Joyce JR, Hanselka DV, Heitmann JM. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. J Am Vet Med Assoc 1977;170:1293-1297.
7. Shenep JL, English BK, Kaufman L, Pearson TA, Thompson JW, Kaufman RA et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to Pythium insidiosum in a child. Clin Infect Dis 1998;27:1388-1393.
8. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:693-715.
9. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Pötter L, Spanamberg A et al. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian Pythium insidiosum strains isolated from animals. J Antimicrob Chemother 2007;60:1168-1171.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2002.
11. Cuenca-Estrella M, Gómez-Lopez A, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Buitrago MJ et al. Combined activity in vitro of caspofungin, amphotericin B, and azoles agents against itraconazole-resistant clinical isolates of Aspergillus fumigatus. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1232-1235.
12. Cury AE, Hirschfeld MP. Interactions between amphotericin B and nitroimidazoles against Candida albicans. *Mycoses* 2005;40:187-192.
13. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DIB, Cavalheiro AS, Spanemberg A et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against Pythium insidiosum isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:767-769.
14. Arai R, Sugita T, Nishikawa A. Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against Candida albicans. *Mycoses* 2005;48:38-41.
15. Barchiesi F, Di Francesco LF, Compagnucci P, Arzeni D, Giacometti A, Scalise G. In vitro interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of Candida albicans. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:59-65.
16. Beggs WH, Sarosi GA, Walker MI. Synergistic action of amphotericin B and rifampicin against Candida species. *J Infect Dis* 1976;133:206-209.
17. Chin N-X, Weitzman I, Della-Latta P. In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against Candida Species and Cryptococcus neoformans. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:850-852.

18. Tucker RM, Denning DW, Hanson LH, Rinaldi MG, Graybill JR, Sharkey PK et al.  
Interaction of azoles with rifampin, phenytoin, and carbamazepine: in vitro and clinical observations. *Clin Infect Dis* 1992;14:165-174.
19. Silva P, Fármacos antifúngicos. In: Silva P, ed. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Table 1. *In vitro* activity of terbinafine, fluvastatin, rifampicin, metronidazole, ibuprofen and amphotericin B against isolated from *Pythium insidiosum*. (n=17) (mg/L).

<b>Drug</b>	<b>MIC range<sup>a</sup></b>	<b>GM<sup>b</sup></b>	<b>MIC<sub>50</sub><sup>c</sup></b>	<b>MIC<sub>90</sub><sup>d</sup></b>
Terbinafine	8 - 32	14.7	16	32
Fluvastatin	16 - 64	40.9	32	64
Rifampicin	32 - > 64	61.4	64	> 64
Metronidazole	32 - 128	66.66	64	128
Ibuprofen	128 - 2048	653.9	512	1024
Amphotericin B	8 - 32	25.06	32	32

<sup>a</sup> The range between the lower and higher minimum inhibitory concentration for all isolates.

<sup>b</sup> Geometric Means of MICs.

<sup>c</sup> Minimum inhibitory concentration of drug capable of inhibiting the growth of 50% of the isolates.

<sup>d</sup> Minimum inhibitory concentration of drug capable of inhibiting the growth of 90% of the isolates.

Table 2. *In vitro* activity of terbinafine (TRB) plus rifampicin (RIF), fluvastatin (FVN), metronidazole (MTZ), ibuprofen (IBP) or amphotericin B (AMB) against *Pythium insidiosum*. (mg/L) (n=17)

Isolate <sup>a</sup>	MIC of combination		FICI <sup>b</sup> (interp.)	MIC of combination		FICI (interp.)	MIC of combination		FICI (interp.)	MIC of combination		FICI (interp.)	MIC of combination		FICI (interp.)
	TRB	RIF		TRB	FVN		TRB	MTZ		TRB	IBP		TRB	AMB	
LAPEMI 119	32	64	3.0 (I)	16	32	2.0 (I)	16	32	2.0 (I)	0.25	256	0.6 (I)	8	2	0.6 (I)
LAPEMI 123	16	64	4.0 (I)	32	32	4.5 (A)	8	32	2.0 (I)	0.5	256	0.3 (S)	8	2	1.0 (I)
LAPEMI 124	32	64	2.0 (I)	32	32	2.0 (I)	32	32	2.0 (I)	0.5	256	0.2 (S)	4	1	0.2 (S)
LAPEMI 125	32	64	2.0 (I)	32	32	2.0 (I)	32	64	2.0 (I)	4	512	0.6 (I)	8	4	0.4 (S)
LAPEMI 126	16	32	3.0 (I)	16	32	3.0 (I)	16	32	2.5 (I)	4	512	1.5 (I)	16	4	2.1 (I)
LAPEMI 128	8	8	0.6 (I)	64	64	5.0 (A)	8	32	0.7 (I)	0.25	512	1.0 (I)	8	4	0.6 (I)
LAPEMI 129	16	32	2.5 (I)	32	32	5.0 (A)	8	32	1.5 (I)	8	256	1.2 (I)	8	2	1.1 (I)
LAPEMI 130	0.25	32	1.0 (I)	16	16	0.7 (I)	0.25	16	0.1 (S)	0.25	128	1.0 (I)	8	4	0.5 (S)
LAPEMI 135	16	0.25	1.0 (I)	8	4	0.7 (I)	4	32	0.7 (I)	8	256	1.0 (I)	2	2	0.2 (S)
LAPEMI 136	16	0.25	1.0 (I)	8	4	0.6 (I)	0.25	32	1.0 (I)	8	256	1.0 (I)	8	0.5	0.6 (I)
LAPEMI 138	16	0.25	1.0 (I)	32	1	2.0 (I)	16	32	1.2 (I)	4	256	0.7 (I)	8	4	0.6 (I)
LAPEMI 144	16	32	2.5 (I)	32	32	5.0 (A)	8	64	2.0 (I)	8	256	1.5 (I)	2	0.5	0.3 (S)
LAPEMI 147	0.25	32	1.0 (I)	32	0.125	2.0 (I)	16	0.5	1.0 (I)	0.25	256	0.1 (S)	16	2	1.0 (I)
LAPEMI 148	8	64	1.0 (I)	16	0.125	1.0 (I)	8	32	1.0 (I)	8	128	0.7 (I)	2	1	0.2 (S)
LAPEMI 187	16	32	2.5 (I)	32	32	4.5 (A)	8	64	2.0 (I)	8	256	1.5 (I)	2	1	0.3 (S)
ATCC 58637	64	64	5.0 (A)	64	32	5.0 (A)	16	2	1.0 (I)	16	2048	2.0 (I)	16	4	1.1 (I)
CBS 101555	32	64	3.0 (I)	32	32	3.0 (I)	8	32	0.7 (I)	8	512	1.5 (I)	16	4	1.1 (I)

<sup>a</sup>LAPEMI, Laboratory of Mycological Research; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures.<sup>b</sup>

Interpretations: S, synergistic; I, indifferent.

## TABELAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO 2 (NÃO PUBLICADAS)

Tabela 1 - Atividade *in vitro* da terbinafina e rifampicina, individualmente e em associação, contra cepas de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação
	Terbinafina	Rifampicina	Terbinafina	Rifampicina	
LAPEMI 119	16	64	32	64	3,0 indiferença
LAPEMI 123	8	32	16	64	4,0 indiferença
LAPEMI 124	32	64	32	64	2,0 indiferença
LAPEMI 125	32	64	32	64	2,0 indiferença
LAPEMI 126	8	32	16	32	3,0 indiferença
LAPEMI 128	16	64	8	8	0,6 indiferença
LAPEMI 129	8	64	16	32	2,5 indiferença
LAPEMI 130	32	32	0,25	32	1,0 indiferença
LAPEMI 135	16	> 64	16	0,25	1,0 indiferença
LAPEMI 136	16	> 64	16	0,25	1,0 indiferença
LAPEMI 138	16	64	16	0,25	1,0 indiferença
LAPEMI 144	8	64	16	32	2,5 indiferença
LAPEMI 147	16	32	0,25	32	1,0 indiferença
LAPEMI 148	16	> 64	8	64	1,0 indiferença
LAPEMI 187	8	64	16	32	2,5 indiferença
ATCC 58637	16	64	64	64	5,0 antagonismo
CBS 101555	16	64	32	64	3,0 indiferença

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária

Tabela 2 - Atividade *in vitro* da terbinafina e fluvastatina, individualmente e em associação, contra cepas de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação	
	Terbinafina	Fluvastatina	Terbinafina	Fluvastatina		
LAPEMI 119	16	32	16	32	2,0	indiferença
LAPEMI 123	8	64	32	32	4,5	antagonismo
LAPEMI 124	32	32	32	32	2,0	indiferença
LAPEMI 125	32	32	32	32	2,0	indiferença
LAPEMI 126	8	32	16	32	3,0	indiferença
LAPEMI 128	16	64	64	64	5,0	antagonismo
LAPEMI 129	8	32	32	32	5,0	antagonismo
LAPEMI 130	32	64	16	16	0,7	indiferença
LAPEMI 135	16	16	8	4	0,7	indiferença
LAPEMI 136	16	64	8	4	0,6	indiferença
LAPEMI 138	16	64	32	1	2,0	indiferença
LAPEMI 144	8	32	32	32	5,0	antagonismo
LAPEMI 147	16	64	32	0,125	2,0	indiferença
LAPEMI 148	16	32	16	0,125	1,0	indiferença
LAPEMI 187	8	64	32	32	4,5	antagonismo
ATCC 58637	16	32	64	32	5,0	antagonismo
CBS 101555	16	32	16	32	2,0	indiferença

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária



Tabela 3 - Atividade *in vitro* da terbinafina e metronidazol (MTZ), individualmente e em associação, contra cepas de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação	
	Terbinafina	MTZ	Terbinafina	MTZ		
LAPEMI 119	16	32	16	32	2,0	indiferença
LAPEMI 123	8	32	8	32	2,0	indiferença
LAPEMI 124	32	32	32	32	2,0	indiferença
LAPEMI 125	32	64	32	64	2,0	indiferença
LAPEMI 126	8	64	16	32	2,5	indiferença
LAPEMI 128	16	128	8	32	0,7	indiferença
LAPEMI 129	8	64	8	32	1,5	indiferença
LAPEMI 130	32	128	0,25	16	0,1	sinergismo
LAPEMI 135	16	64	4	32	0,7	indiferença
LAPEMI 136	16	32	0,25	32	1,0	indiferença
LAPEMI 138	16	128	16	32	1,2	indiferença
LAPEMI 144	8	64	8	64	2,0	indiferença
LAPEMI 147	16	128	16	0,5	1,0	indiferença
LAPEMI 148	16	64	8	32	1,0	indiferença
LAPEMI 187	8	64	8	64	2,0	indiferença
ATCC 58637	16	64	16	2	1,0	indiferença
CBS 101555	16	128	8	32	0,7	indiferença

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária

Tabela 4 - Atividade *in vitro* da terbinafina e ibuprofeno, individualmente e em associação, contra cepas de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação
	Terbinafina	Ibuprofen	Terbinafina	Ibuprofen	
LAPEMI 119	16	512	0,25	256	0,6 indiferença
LAPEMI 123	8	1024	0,5	256	0,3 sinergismo
LAPEMI 124	32	1024	0,5	256	0,2 sinergismo
LAPEMI 125	32	1024	4	512	0,6 indiferença
LAPEMI 126	8	512	4	512	1,5 indiferença
LAPEMI 128	16	512	0,25	512	1,0 indiferença
LAPEMI 129	8	1024	8	256	1,2 indiferença
LAPEMI 130	32	128	0,25	128	1,0 indiferença
LAPEMI 135	16	512	8	256	1,0 indiferença
LAPEMI 136	16	512	8	256	1,0 indiferença
LAPEMI 138	16	512	4	256	0,7 indiferença
LAPEMI 144	8	512	8	256	1,5 indiferença
LAPEMI 147	16	2048	0,25	256	0,1 sinergismo
LAPEMI 148	16	512	8	128	0,7 indiferença
LAPEMI 187	8	512	8	256	1,5 indiferença
ATCC 58637	16	2048	16	2048	2,0 indiferença
CBS 101555	16	512	8	512	1,5 indiferença

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária

Tabela 5 - Atividade *in vitro* da terbinafina e anfotericina B (AMB), individualmente e em associação, contra cepas de *Pythium insidiosum*. (n=17)

Identificação dos Isolados <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> droga sozinha (µg/ml)		CIM na combinação (µg/ml)		ICIF <sup>c</sup> e interpretação	
	Terbinafina	AMB	Terbinafina	AMB		
LAPEMI 119	16	16	8	2	0,6	indiferença
LAPEMI 123	8	32	8	2	1,0	indiferença
LAPEMI 124	32	16	4	1	0,2	sinergismo
LAPEMI 125	32	32	8	4	0,4	sinergismo
LAPEMI 126	8	32	16	4	2,1	indiferença
LAPEMI 128	16	32	8	4	0,6	indiferença
LAPEMI 129	8	16	8	2	1,1	indiferença
LAPEMI 130	32	16	8	4	0,5	sinergismo
LAPEMI 135	16	32	2	2	0,2	sinergismo
LAPEMI 136	16	32	8	0,5	0,6	indiferença
LAPEMI 138	16	32	8	4	0,6	indiferença
LAPEMI 144	8	32	2	0,5	0,3	sinergismo
LAPEMI 147	16	32	16	2	1,0	indiferença
LAPEMI 148	16	8	2	1	0,2	sinergismo
LAPEMI 187	8	32	2	1	0,3	sinergismo
ATCC 58637	16	32	16	4	1,1	indiferença
CBS 101555	16	32	16	4	1,1	indiferença

<sup>a</sup> LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>b</sup> Concentração inibitória mínima

<sup>c</sup> Índice de concentração inibitória fracionária

Tabela 6 – Atividade *in vitro* das associações de terbinafina à fluvastatina, rifampicina, metronidazol, ibuprofeno e anfotericina B contra isolados de *Pythium insidiosum*.

Combinação	Atividade antifúngica		
	Sinérgica % (n)	Indiferente % (n)	Antagônica % (n)
Terbinafina/Fluvastatina	0,00 ( 0 )	64,70 ( 11 )	35,30 ( 6 )
Terbinafina/Rifampicina	0,00 ( 0 )	94,12 ( 16 )	5,88 ( 1 )
Terbinafina/Metronidazol	5,88 ( 1 )	94,12 ( 16 )	0,00 ( 0 )
Terbinafina/Ibuprofeno	17,65 ( 3 )	82,35 ( 14 )	0,00 ( 0 )
Terbinafina/Anfotericina B	41,18 ( 7 )	58,82 ( 10 )	0,00 ( 0 )

#### 4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos com diferentes mecanismos de ação e o possível efeito sinérgico obtido pela combinação de agentes antifúngicos com fármacos de outras classes farmacêuticas têm despertado grande interesse nestas associações. A associação de terapias pode ser uma alternativa à monoterapia para pacientes com infecções invasivas causadas por microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais.

Nos últimos anos, a pitiose vem merecendo destaque na micologia veterinária e humana, principalmente devido às dificuldades encontradas no tratamento das espécies afetadas e ao aumento do número de casos diagnosticados (SANTURIO *et al.*, 2006).

Os artigos que descrevem a quimioterapia antifúngica para pitiose em animais e humanos, com fármacos como anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol e terbinafina apontam resultados variáveis e muitas vezes contraditórios, quando comparados aos resultados dos testes *in vitro* (McMULLAN *et al.*, 1977; GONZALES *et al.*, 1979; FOIL *et al.*, 1984; ENGLISH & FROST, 1984; BISSONNETTE *et al.*, 1991; TRISCOTT *et al.*, 1993; SHENEP *et al.*, 1998; DYKSTRA *et al.*, 1999, JAEGER *et al.*, 2002; GROOTERS, 2003; RIVIERRE *et al.*, 2005; PUPAIBOOL *et al.*, 2006).

SHENEP *et al.* (1998) afirmaram que a cura farmacológica da pitiose com antifúngicos é possível, porém, sempre deve ser acompanhada por testes de suscetibilidade *in vitro*. Todavia, estudos de suscetibilidade a antifúngicos com *P. insidiosum* são escassos, não havendo dados de padronização para testes *in vitro* com este oomiceto.

Devido à pitiose ser uma doença problemática, tendo em vista as dificuldades no tratamento e o risco de morte principalmente para humanos e eqüinos, as possibilidades de novos e potentes efeitos antifúngicos obtidos através de terapia combinada requer urgente investigação. Este estudo teve como foco principal a terbinafina, pois estudos prévios já haviam demonstrado que o *P. insidiosum* pode ser sensível a este agente antimicótico (ARGENTA *et al.*, 2008; SHENEP *et al.*, 1998). Além disso, iniciamos nosso estudo de atividade *in vitro* selecionando fármacos (inclusive de outras classes farmacêuticas) que já evidenciaram alguma atividade antifúngica em outros estudos (ARAI *et al.*, 2005; BARCHIESI *et al.*, 1998; BEGGS *et al.*, 1976; CHIN *et al.*, 1997; CURY & HIRSCHFELD, 1997).

O mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos e da terbinafina é a inibição da síntese do ergosterol fúngico, diferindo somente em que ponto esta via de biosíntese é bloqueada. *P. insidiosum* não possui ergosterol em sua membrana plasmática, entretanto alguns autores sugerem que este microrganismo tem a capacidade de assimilar ergosterol exógeno, requerido para a sua reprodução e estimulando seu crescimento vegetativo (WARNER *et al.*, 1986).

O inóculo utilizado nos ensaios *in vitro*, foi preparado a partir de uma suspensão de zoósporos de *P. insidiosum*. Para a obtenção dos zoósporos utilizou-se o protocolo de zoosporogênese baseado na técnica previamente descrita por MENDOZA & PRENDAS (1988), com algumas modificações em função da quantidade de inóculo exigida para os testes *in vitro* (PEREIRA *et al.*, 2007). Avaliando a técnica de zoosporogênese, MENDOZA & PRENDAS (1988) em um estudo realizado com nove isolados de *P. insidiosum* observaram que o número máximo de zoósporos foi obtido após uma hora e meia de incubação em Meio de Indução a 37<sup>0</sup>C, quando utilizaram o cultivo prévio em grama em meio agar água a 2% por 24 horas a 37<sup>0</sup>C. Já ao utilizarem o cultivo em fragmentos de grama em outros meios como Ágar Sabouraud e CMA, verificaram que o tempo de incubação aumentou para quatro dias e o período de maior produção de zoósporos ocorreu após cinco horas e meia de incubação. Já PEREIRA *et al.* (2008) observaram que, de 32 isolados de *P. insidiosum* estudados, 16 amostras (50%) produziram 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>, 12 isolados (37,5%) produziram acima de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>, enquanto quatro amostras (12,5%) produziram menos de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>. O período de maior produção de zoósporos foi entre 6 e 8 horas de incubação. Desta forma, concluíram que o protocolo utilizado na indução da zoosporogênese mostrou-se eficiente, podendo ser utilizado tanto para a identificação do *P. insidiosum*, como para a obtenção de zoósporos em quantidades suficientes para a inoculação em animais experimentais e aplicação no desenvolvimento de testes de suscetibilidade.

Embora o documento M38-A preconize que as concentrações de inóculos viáveis de esporangiósporos ou conídios se situem na faixa de 0,4 x 10<sup>4</sup> a 5 x 10<sup>4</sup> UFC/mL (NCCLS, 2002), em virtude das características do *P. insidiosum*, o inóculo utilizado neste estudo situou-se abaixo desse valor, pois não foi possível induzir-se produção de zoósporos em quantidades próximas aos valores preconizados pelo documento. Entretanto, a concentração de inóculo que se utilizou estava de acordo com a concentração já descrita

por PEREIRA *et al.* (2007), utilizando teste de microdiluição em caldo, obtendo resultados satisfatórios.

Observando a metodologia que se utilizou, enfatiza-se que a vantagem da contagem de zoósporos em câmara de Neubauer é que através desse método pode-se quantificar o inóculo, obtendo desta forma um inóculo padronizado, sendo que a quantificação por meio de espectrofotometria não é possível devido à ausência de turvação do meio pela suspensão de zoósporos. A preparação do inóculo com suspensão de hifas ajustada por espectrofotometria, como citado por SEKHON *et al.* (1992), pode não ser a melhor opção, pois ESPINEL-INGROFF *et al.* (1997) consideram que a preparação de inóculo com suspensão de hifas não é confiável; relatam que ocorrem variações de até três concentrações entre as CIMs, quando as mesmas são comparadas com testes realizados com inóculos empregando conídios.

Outro ponto crítico nos testes de suscetibilidade *in vitro* é o meio de cultivo utilizado nos ensaios. O caldo RPMI 1640 tem sido indicado para testes de suscetibilidade *in vitro* de leveduras e fungos filamentosos, demonstrando bons resultados de reprodutibilidade (GIL-LAMAIGNERE *et al.*, 2005). Neste estudo, os 17 isolados de *P. insidiosum* testados apresentaram crescimento visível e homogêneo de hifas em caldo RPMI, em 24 horas a 37<sup>0</sup>C, permitindo fácil leitura das CIMs. Resultados similares são citados por GIL-LAMAIGNERE *et al.* (2005) ao avaliarem a influência do meio na leitura das CIMs de caspofungina, voriconazol e posaconazol em testes de suscetibilidade com zigomicetos; PEREIRA *et al.* (2007) ao avaliarem a CIM de caspofungina frente a 27 isolados de *P. insidiosum*, relataram resultados semelhantes.

No presente estudo as avaliações foram realizadas com técnica de microdiluição em caldo devido à facilidade de execução da técnica, sendo que demanda menos tempo que a macrotécnica e os resultados têm ótima reprodutibilidade.

Frente a terbinafina, as CIMs obtidas neste estudo foram superiores às relatadas por ARGENTA *et al.* (2008); provavelmente as condições de crescimento e principalmente a leitura sejam responsáveis por estas discrepâncias. Conforme já referido, a microdiluição é um processo mais fácil de ser realizado, todavia a leitura final é mais difícil do que as observadas na macrotécnica em função dos pequenos volumes utilizados na microtécnica.

Entre os fármacos que utilizamos, rifampicina, ibuprofeno, metronidazol e fluvastatina ainda não haviam sido testados contra *P. insidiosum* (**Capítulo 2; Artigo 2**).

Em nosso estudo, com exceção da rifampicina, as CIMs para todos os fármacos não-antifúngicos foram menores que as maiores concentrações testadas, o que foi de acordo com estudos prévios com estes agentes que indicaram algum grau de atividade antifúngica (ARAI *et al.*, 2005; BEGGS *et al.*, 1976; CHIN *et al.*, 1997; CURY & HIRSCHFELD, 1997). Por outro lado, baseado em nossos resultados, estes agentes não-antifúngicos combinados com terbinafina foram menos efetivos.

Neste estudo, a associação TRB-FVN foi indiferente ou antagonista para 100% das cepas. Contra *Candida spp* e *Cryptococcus neoformans* as combinações com fluconazol ou itraconazol resultaram em efeitos aditivos e sinérgicos (CHIN *et al.*, 1997). Estudos futuros ajustando as combinações de itraconazol mais fluvastatina contra *P. insidiosum* devem ser avaliados.

Rifampicina combinada com terbinafina foi indiferente ou antagonista para 100% das cepas. Contra espécies de *Candida* as associações anfotericina B mais rifampicina mostraram efeitos sinérgicos (BEGGS *et al.*, 1976). Analisando as interações com azólicos os resultados com rifampicina são muito contraditórios (TUCKER *et al.*, 1992).

Em outro estudo contra espécies de *Candida*, combinando metronidazol com anfotericina B, foram relatadas interações sinérgicas e aditivas (CURY & HIRSCHFELD, 1997). Aqui, evidenciamos indiferença para 94,12% das cepas de *P. insidiosum* estudadas.

Ibuprofeno, um agente antiinflamatório, exibiu atividade antifúngica contra *Candida albicans* quando combinado com fluconazol (ARAI *et al.*, 2005). Contra *P. insidiosum* observamos interações indiferentes para 82,35% das cepas; entretanto, contra três cepas (17,65%) notamos efeito sinérgico.

A combinação de terbinafina com anfotericina B mostrou sinergismo para 41,18% das cepas e nenhum efeito antagonista foi detectado. BARCHIESI *et al.* (1998) já haviam reportado indiferença ou sinergismo para esta combinação contra cepas de *Candida spp*; nossos resultados são similares. O principal mecanismo de ação da anfotericina B é sua interação com o esterol na membrana celular do fungo, aumentando a permeabilidade e ocorrendo perda de moléculas importantes para a célula fúngica. Devido ao *P. insidiosum* não possuir ergosterol na membrana celular, outro mecanismo adicional pode estar envolvido (SILVA, 2006). Finalmente, esta associação é um achado que pode ser uma futura alternativa para o tratamento da pitiose, tornando-se essencial a realização de experimentos *in vivo*.

Levando em consideração a atividade individual dos fármacos avaliados, os resultados deste estudo são difíceis de interpretar devido aos escassos estudos prévios de



suscetibilidade com *P. insidiosum*, e, aqueles já reportados, foram realizados em diferentes condições técnicas como macrodiluição (ARGENTA *et al.*, 2008) ou não foi referida a metodologia empregada (SHENEP *et al.*, 1998).

Além disso, os *breakpoints* (valor de referência para definição de resistente ou sensível) para testes de suscetibilidade com agentes antifúngicos são bem definidos somente para fluconazol, itraconazol, voriconazol e flucitosina contra espécies de *Candida* (NCCLS, 2002). Para fungos filamentosos os *breakpoints* estão definidos para anfotericina B, flucitosina, fluconazol, cetoconazol e itraconazol contra algumas espécies de *Aspergillus*, espécies de *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii*, (*Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii*.

Também, os testes de suscetibilidade realizados sugerem uma fraca atividade antifúngica dos agentes selecionados, o que está de acordo com as falhas terapêuticas no tratamento da pitiose, já bem conhecidas. Por outro lado, os resultados obtidos com as combinações de fármacos, baseadas nos ICIFs, podem ser interpretados com mais otimismo.

Estudos com combinações de fármacos frente a *P. insidiosum* são quase inexistentes; recentemente ARGENTA *et al.* (2008) reportaram que a combinação de terbinafina mais itraconazol ou voriconazol resultaram em sinergismo contra 17% das cepas estudadas, e antagonismo não foi observado. O primeiro relato de efeito sinérgico entre terbinafina e itraconazol foi realizado por SHENEP *et al.* (1998) obtendo sucesso no tratamento de um menino com infecção facial invasiva profunda causada pelo *P. insidiosum*.

No presente estudo foram obtidos sinergismos significantes: as combinações terbinafina mais fluconazol, terbinafina mais caspofungina (**Capítulo 1; Artigo 1**) e terbinafina mais anfotericina B (**Capítulo 2; Artigo 2**) foram sinérgicas para 41,18% das cepas de *P. insidiosum*. Os sinergismos obtidos pelas combinações de terbinafina mais cetoconazol (29,4%) e terbinafina mais miconazol (11,76%) também merecem atenção (**Capítulo 1; Artigo 1**). Estes sinergismos observados frente a *P. insidiosum* são inéditos, sendo aqui reportados pela primeira vez. Os resultados demonstraram antagonismo somente nas combinações de terbinafina mais fluvastatina (35,30%) e terbinafina mais rifampicina (5,88%) (**Capítulo 2; Artigo 2**).

Outro fato importante que requer atenção foi a grande variação de suscetibilidade entre as cepas de *P. insidiosum*. Este fato pode refletir a complexidade da biologia do *P. insidiosum*, que pode estar relacionada com variabilidade genética; estudos moleculares já

têm pontuado este problema, que pode requerer novas estratégias para tratamentos (SCHURKO *et al.*, 2003).

Apesar destes aspectos ainda inexplicáveis, os achados *in vitro* obtidos neste estudo mostram que agentes antifúngicos em combinação podem ser alternativas que devem ser exploradas experimentalmente através de estudos *in vivo* para confirmar o potencial terapêutico de sinergismos contra *P. insidiosum*.

## 5. CONCLUSÕES

1. Miconazol e Terbinafina evidenciaram boa atividade contra *P. insidiosum* *in vitro*.

2. A combinação de terbinafina mais fluconazol, caspofungina ou anfotericina B contra *P. insidiosum*, *in vitro*, reduziu significativamente as CIMs destes fármacos quando comparado às CIMs destes mesmos fármacos utilizados separadamente.

3. Os fármacos não-antifúngicos (ibuprofeno, fluvastatina, rifampicina e metronidazol) combinados com terbinafina, *in vitro*, não são ativos contra *P. insidiosum*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABRUZZO, G.K. et al. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 11, p. 2333-2338, 1997.

ADER, P.L. Phycomycosis in fifteen dogs and two cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 174, n.11, p. 1216-1223, 1979.

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

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

AUSTWICK P.K.C.; COPLAND J.W. Swamp cancer. **Nature**. v. 250, p. 84, 1974.

BARCHIESI, F. et al. *In vitro* interaction of terbinafina with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, p. 59-65, 1998.

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

BEGGS, W. H.; SAROSI, G. A.; WALKER, M. I. Synergistic action of anphotericin B and rifampicin against *Candida* species. **Journal of Infectious Diseases**. v. 133, p. 206-209, 1976.

BENNETT, J. E. Antimicrobial Agents: Antifungal agents, Chapter 48. In: Goodman & Gilman (ed.). **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 11<sup>th</sup> Ed., Digital Edition Set ISBN: 0-07-146804-8, 2006.

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

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

BRIDGES, C.H. & EMMONS, C.W. A phycomycosis of horses caused by *Hyphomyces destruens*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 138, n. 11, p. 579-589, 1961.

CAMUS, A.C.; GROOTERS, A.M.; AQUILAR, R.F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 16, p. 567-571, 2004.

CARVALHO, E.C.Q. et al. *Hyphomyces destruens*: agente de “Ferida Brava” (hifomicose) em eqüídeos do Pantanal de MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XIX, 1984, Cuiabá. **Annais...**, Cuiabá, 1984, p. 311.

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

CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.

CHETCHOTISAKD P. et al. Human pythiosis in Srinagarind Hospital: one year's experience. **Journal of Medical Association of Thailand**. vol. 75, p. 248-254, 1992.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard – second edition. CLSI document M38-A2 (ISBN 1-56238-668-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

COWEN, L.E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature Reviews Microbiology**. v. 6, n. 3, p. 187-198, 2008.

CUENCA-ESTRELLA M. et al. Comparative *in vitro* activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 43, n. 1, p. 149-151, 1999.

CURY, A.E.; HIRSCHFELD, M.P. Interactions between amphotericin B and nitroimidazoles against *Candida albicans*. **Mycoses**. v. 40, n. 5-6, p. 187-192, 1997.

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

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

DROUIN V. apud GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 33, p. 696, 2003.

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

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

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n. 1, p. 139-143, 1997.

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

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

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

GHANNOUM, M.A. Mechanisms potentiating *Candida* infections, A Review. **Mycoses**. v. 31, n. 11, p. 543-557, 1999.

GIL-LAMAIGNERE, C. et al. Effect of media composition and *in vitro* activity of posaconazole, caspofungina and voriconazole against zygomycetes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 55, p. 1016-1019, 2005.

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

GONZÁLES, H.E. et al. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. **Revista ICA**. v. 14, n. 2, p. 115-122, 1979.

GOSBELL I.B. et al. Cure of orthopaedic infection with *Scedosporium prolificans*, using voriconazole plus terbinafine, without the need for radical surgery. **Mycoses**. v. 46, n. 5-6, p. 233-266, 2003.

GRAYBILL, J.R. et al. Treatment of histoplasmosis with MK-991 (L-743,872). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, n. 1, p. 151-153, 1998.

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

HAZEN, K.C. et al. Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 183, p. 89-94, 2000.

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.

HEALTH, J.A. et al. *Pythium insidiosum* pleuropericarditis complicating pneumonia in a child with leukemia. **Clinical Infectious Diseases**. v. 35, p. 60-64, 2002.

HENDRIX, J.W. Sterols in growth and reproduction of fungi. **Annual Review Phytopathology**. v. 8, p. 111-130, 1970.

HOWDEN, B.P. et al. Successful control of disseminated *Scedosporium prolificans* infection with a combination of voriconazole and terbinafine. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 22, n. 2, p. 111-113, 2003.

ICHITANI, T.; AMEMIYA, J. *Pythium gracile* isolated from the foci of granular dermatitis in the horse (*Equus caballus*). **Transactions of Mycological Society Japan**. v. 21, p. 263-265, 1980.

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

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

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

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

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

JOHNSON, M.D. et al. Minireview: Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

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

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

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

KWON-CHUNG, K.J. Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Diseases**. v. 19, suppl. (1), p. 1-7, 1994.



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

LEE, H.B. et al. Activity of some aminoglycoside antibiotics against true fungi, *Phytophthora* and *Pythium* species. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, p. 836-843, 2005.

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

LEWIS, R.E. et al. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 49, p. 345-351, 2002.

LI, D. et al. Detection of  $\alpha$ -thalassemia in  $\beta$ -thalassemia carriers and prevention of Hb Bart's hydrops fetalis through prenatal screening. **Haematologica**. v. 91, n. 5, p. 649-651, 2006.

LEBLANC, C.J. Hypercalcemia associated with gastric pythiosis in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 37, n. 1, p. 115-120, 2008.

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

MCDUGALL P.N. et al. Neonatal systemic candidiasis: a failure to respond to intravenous miconazole in two neonates. **Archives of Disease in Childhood**. v. 57, n. 11, p. 884-886.

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

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

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

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

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31, n. 11, p. 2967-2973, 1993.

MENDOZA, L.; 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.; MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* De Cock et al. 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987. **Mycoses**. v. 32, n. 2, p. 73-77, 1989.

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_. Immunological studies on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, p. 227-231, 1982a.

MILLER, R.I.; OLCOTT, B.M.; ARCHER, M. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 186, n. 9, p. 984-986, 1985.

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

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

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

NEGRONI, R. et al. Results of miconazole therapy in twenty-eight patients with paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 70, Suppl 1, p. 24-28, 1977.

ONVEWU, C. et al. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 3, p. 956-964, 2003.

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

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

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

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

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

PETRAITIENE, R. et al. Antifungal efficacy of caspofungin (MK-0991) in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: Pharmacokinetics, drug

disposition, and relationship to galactomannan antigenemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 1, p. 12-23, 2002.

POWLES, M.A. et al. Efficacy of MK-991 (L-743,872), a semisynthetic pneumocandin, in murine models of *Pneumocystis carinii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 1985-1989, 1998.

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

PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis. **Emerging Infectious Diseases**; v. 12, p. 517–518, 2006.

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

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**. São Paulo: Elsevier, 2004. 703 p.

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

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

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

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

ROLAN, P.E. et al. Phenytoin intoxication during treatment with parenteral miconazole. **British Medical Journal (Clinical Research Ed)**. v. 287, n. 6407, p. 1760, 1983.

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.

SANAVRIA, A. 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. 170-172, 2000.

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

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

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

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

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

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

SANTURIO, J.M. *Pythium insidiosum*: Avaliação de imuniterápico para eqüinos, utilizando-se coelhos como modelo experimental. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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

SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic cluster: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and Americas are explored. **Mycologia**. v. 95, n. 2, p. 200-208, 2003.

SCOTT, E.M.; TARIQ, V.N.; MCCRORY, R.M. Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against *Candida albicans in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 12, p. 2610-2614, 1995.

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

SHIPTON, W.A. *Pythium destruens* sp., nov., na agent of equine pythiosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 25, p. 137-151, 1987.

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.

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

SMITH, F. apud GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 33, p. 696, 2003.

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

SPINOSA H.S., GÓRNIAC S.L., BERNARDI M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SUNG, J.P.; GRENDahl, J.G.; LEVINE, H.B. Intravenous and intrathecal miconazole therapy for systemic mycoses. **The Western Journal of Medicine**. v. 126, n. 1, p. 5-13, 1977.

TABOSA, I.M. et al. Pitiose cutânea em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 51, p. 27-30, 1999.

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

TANPHAICHITRA D. Tropical disease in the immunocompromised host: melioidosis and pythiosis. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 11, suppl. 7, p. S1629-1643, 1989.

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

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

TUCKER, R.M. et al. Interaction of azoles with rifampin, phenytoin, and carbamazepine: *in vitro* and clinical observations. **Clinical Infectious Diseases**. v. 14, p. 165-174, 1992.

TÚRY, E.; CORÔA A.C. Pitiose cutânea em equinos no Estado do Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXV, 1997, Gramado. **Annais...** Gramado, 1997. p.150.

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

WARNER, S. A. et al. A novel lipoprotein from Oomycete fungi, **Experimental Mycology**. v. 10, p. 315, 1986.

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

WELLEHAN, J.F. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 35, n. 4, p. 564-568, 2004.

WU, T. et al. Enhanced Extracellular Production of Aspartyl Proteinase, a Virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 5, p. 1220-1208, 2000.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.