

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

**SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE ISOLADOS DE *Pythium  
insidiosum* FRENTE A AMINOGLICOSÍDEOS E TIGECICLINA.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Deise Luiza Mahl**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum* FRENTE A AMINOGLICOSÍDEOS E TIGECICLINA.**

**por**

**Deise Luiza Mahl**

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**

**2012**

**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

**SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum*  
FRENTE A AMINOGLICOSÍDEOS E TIGECICLINA.**

elaborada por  
**Deise Luiza Mahl**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

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

---

**Syney Hartz Alves, Dr.**  
(UFSM-RS)

---

**Sônia de Avila Botton, Dra**  
(UFSM-RS)

Santa Maria, 15 Março de 2012.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais,

**Astor Miguel Mahl e  
Onise Gorett Hochscheidt Mahl**

e a minha irmã

**Gabriela Hochscheidt Mahl**

Por agradecimento ao apoio, compreensão, amor e valores que me foram passados.

Ao meu companheiro,

**Rafael Duquech de Paula**

Pelo companheirismo, compreensão e paciência que foram essenciais neste período.

## AGRADECIMENTOS

A minha família, gostaria de agradecer o apoio, compreensão e amor. Por entenderem os períodos de ausência física durante este tempo, inclusive em algumas datas importantes em que não foi possível estar presente, mas estiveram sempre presentes no meu pensamento. A distância só me fez dar ainda mais valor aqueles que realmente amo, aumentando a saudade e a conta telefônica.

Aos meus pais pelo exemplo de honestidade, integridade e por me mostrarem a importância da luta para o alcance de nossos objetivos. A minha irmã Gabriela, pela amizade e confiança, com quem sei que sempre vou poder contar.

A minha alma gêmea Rafael, agradeço por me acompanhar e apoiar, mesmo quando o destino me guiou para outra direção você me provou todo o seu amor, largando a segurança da sua família e me acompanhando para outros rumos, construindo o começo da nossa família. Amo-te muito! Ao nosso filho felino Negresco, que apesar das mordidas sempre esteve deitado ao meu lado nos momentos de escrita, se mostrando um companheiro sem igual.

Aos meus avós, Eli e José (*in memoriam*), por me esperarem de braços abertos e cheios de carinho e guloseimas nos feriados e poucos fins de semana em que pude estar com vocês neste período.

Ao meu orientador, Professor Dr. Janio Morais Santurio, a quem devo a confiança depositada, o meu aprendizado, e a compreensão nestes últimos períodos. Muito obrigada por tudo!

Aos Professores Dr. Sydney Hartz Alves e Dr<sup>a</sup> Sônia Botton, pelo apoio e auxílio.

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

Ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) por me acolher durante estes dois anos e meio, oportunizando a realização deste trabalho.

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

Aos amigos que fazem e fizeram parte do LAPEMI, que estiveram sempre ao meu lado, agradeço a todos, pois todos tiveram participação no desenvolvimento deste trabalho. Com um agradecimento especial a Érico Loreto e a Francielli Pantella Kunz de Jesus, sem os quais este trabalho não teria sido realizado, agradeço imensamente a dedicação e a ajuda de vocês.

## RESUMO

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

### **SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum* FRENTE A AMINOGLICOSÍDEOS E TIGECICLINA.**

Autor: Deise Luiza Mahl

Orientador: Janio Morais Santurio

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 15 de março de 2012.

Pitiose é uma doença crônica que afeta humanos, outros mamíferos e pássaros. O seu agente etiológico é um oomiceto aquático denominado *Pythium insidiosum*. A Pitiose evolui rapidamente e pode se tornar fatal se não tratada nos primeiros estágios. A ausência de ergosterol na parede da célula deste oomiceto impede o tratamento de pitiose com terapia antifúngica, pois a maioria das drogas antifúngicas atua sobre a síntese de ergosterol. Os membros do gênero *Pythium* são conhecidos por serem susceptíveis a alguns antimicrobianos do grupo das tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos e cloranfenicol. Este estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* frente aos aminoglicosídeos gentamicina, neomicina, paromomicina e estreptomicina e ao derivado da minociclina denominado de tigeciclina. Os testes de susceptibilidade foram realizados com 24 isolados de *P. insidiosum*, utilizando o método de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de gentamicina, neomicina, paromomicina e estreptomicina variaram de 32 a 64 mg/L, e os valores de concentração fungicida mínima (CFM) variaram de 32 a 128 mg/l. Tigeciclina apresentou boa atividade inibitória, com valores de CIM (0,25-2 mg/L) e CFM (1-8 mg/L). A susceptibilidade à tigeciclina observada *in vitro* faz deste fármaco uma boa opção em futuros ensaios e *in vivo*, investigando o tratamento da pitiose.

Palavras-chave: Pitiose. Tratamentos. Microdiluição em caldo. CIM. CFM. Glicilciclina.

## ABSTRACT

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

### ***In vitro* SUSCEPTIBILITY OF *Pythium insidiosum* ISOLATES TO AMIGLICOSIDES AND TIGECYCLINE.**

Pythiosis is a chronic disease that affects humans, other mammals and birds. It is caused by the aquatic oomycete *Pythium insidiosum*. Pythiosis progresses rapidly and can become life threatening if not treated in the early stages. The absence of ergosterol in the cell wall of this oomycete prevents the treatment of pythiosis with antifungal therapy because most antifungal drugs act by inhibiting the synthesis of ergosterol. Members of the genus *Pythium* are known to be susceptible to some antimicrobial of the tetracycline, macrolide, aminoglycoside and chloramphenicol classes. This study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of isolates of *P. insidiosum* to the aminoglycosides gentamicin, neomycin, paromomycin and streptomycin and to the minocycline derivative tigecycline. The susceptibility tests were carried out with 24 *P. insidiosum* isolates using the broth microdilution method in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M38-A2. The minimum inhibitory concentration (MIC) values for gentamicin, neomycin, paromomycin and streptomycin ranged from 32 to 64 mg/L, and the minimal fungicidal concentration (MFC) values ranged from 32 to 128 mg/L. Tigecycline had a good inhibitory activity, with values of mic MIC (0.25-2 mg/L) and MFC (1-8 mg/L) values. The observed *in vitro* susceptibility to tigecycline makes this drug a good option for future *in vivo* assays investigating options of treatment of pythiosis.

Key words: Pythiosis. Treatment. Antimicrobial. Broth microdilution. MIC. FMC. Glicilcycline



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da paromomicina.....	23
Figura 2. Estrutura química da gentamicina.....	25
Figura 3. Estrutura química da neomicina.....	26
Figura 4. Estrutura química da estreptomicina.....	28
Figura 5. Estrutura química da tigeciclina.....	30
Figura 6. Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Pythium insidiosum</i> frente a tigeciclina.....	40

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

Table 1- MIC and MFC values for the aminoglycosides and tigecycline against 24 *Pythium insidiosum* isolates.....50

Tabelas suplementares

Tabela 1- Distribuição das 24 amostras de *Pythium insidiosum* classificadas pela origem e espécie em que foram isoladas.....37

Tabela 2- Valores de CIM e CFM de paromomicina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*...51

Tabela 3- Valores de CIM e CFM de gentamicina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.....52

Tabela 4- Valores de CIM e CFM de neomicina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.....53

Tabela 5- Valores de CIM e CFM de estreptomicina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.54

Tabela 6- Valores de CIM e CFM de tigeciclina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.....55

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 <i>Pythium insidiosum</i> .....	15
2.2 Epidemiologia da pitiose.....	16
2.3 Manifestações clínicas de pitiose.....	18
2.4 Tratamento da pitiose.....	19
2.5 Fármacos aminoglicosídeos.....	21
2.5.1 Paromomicina.....	23
2.5.2 Gentamicina.....	24
2.5.3 Neomicina.....	25
2.5.4 Estreptomicina.....	27
2.6 Grupo das glicilciclinas.....	28
2.6.1 Tigeciclina.....	29
2.7 Uso de antimicrobianos frente aos organismos fúngicos.....	30
2.8 Susceptibilidade da família Pythiaceae aos antimicrobianos.....	32
2.9 Testes para avaliação de susceptibilidade <i>in vitro</i> para <i>Pythium insidiosum</i> .....	34
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
4.1 Local do experimento.....	36
4.2 Amostras de <i>P. insidiosum</i> .....	36
4.3 Avaliação da susceptibilidade de <i>P. insidiosum</i> aos antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo.....	38
4.3.1 Agentes antimicrobianos.....	38
4.3.1.1 Diluição dos antimicrobianos.....	38
4.3.2 Preparação dos inóculos.....	39

4.3.3 Inoculação nas placas de microdiluição.....	39
4.3.4 Incubação e leitura dos testes.....	40
<b>MANUSCRITO.....</b>	<b>42</b>
Abstract.....	44
References.....	48
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pitiose é uma doença crônica que afeta humanos, animais mamíferos e aves, cujo agente é o oomiceto *Pythium insidiosum*. Ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996; MENDOZA et al., 1996), sendo a fonte de infecção os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais, bem como entre animais e o homem (MENDOZA et al., 1996). O caráter progressivo da doença em animais imunocompetentes sugere uma resposta imunológica inadequada ou o seu bloqueio (MILLER, 1981; WANACHIWANAWIN et al., 2004).

A espécie equina é a mais atingida, principalmente nas formas cutânea e subcutânea. Nestes animais, a enfermidade caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos, com a presença de massas necróticas denominadas *kunkers* (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES et al., 1993). Nas demais espécies relatadas, os *kunkers* não são observados. Em caninos e felinos a doença se manifesta principalmente nas formas cutânea e gastrointestinal (GROOTERS, 2003), e subcutânea em bovinos e ovinos (SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; TABOSA et al., 2004). Em humanos, a doença apresenta-se nas formas oftálmica, cutânea, subcutânea e disseminada, sendo que na Tailândia, os indivíduos portadores de Talassemia são os mais afetados (KRAJAEJUN et al., 2006).

A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos está retratada através de diferenças fenotípicas e genotípicas. A quitina, um componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, onde aparecem como componentes predominantes celulose e  $\beta$ -glucana (HENDRIX, 1964). Também os oomicetos diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, nos primeiros ele não é sintetizado, sendo utilizado esteróis exógenos (GROOTERS, 2003). Estes fatos dificultam o tratamento da pitiose através de terapias antifúngicas, devido ao fato da maioria destes fármacos atuarem inibindo a síntese de ergosterol (SANTURIO et al., 2006; GROOTERS, 2003).

Diversos protocolos para o tratamento tem sido utilizados frente à pitiose, principalmente em equinos, incluindo tratamento químico (antifúngicos), cirúrgico e a imunoterapia. A imunoterapia, proposta inicialmente por Miller (1981), surgiu como uma alternativa concreta para

o controle da doença e tem apresentado resultados animadores, com cerca de 70% de cura em equinos e 50% em humanos (MONTEIRO, 1999).

Membros do gênero *Pythium* possuem sensibilidade a antimicrobianos direcionados a unidade 70S dos ribossomos como: tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, eritromicina e paromomicina (LEARY et al., 1982; MARCHANT & SMITH, 1968; RAWN & VAN ETTEN, 1978; TSAO, 1970; LEE et al., 2005), porém existe uma carência de estudos que enfoquem a atividade *in vitro* de drogas antibacterianas sobre o desenvolvimento de *P. insidiosum* em diferentes concentrações *in vitro*. A maioria dos estudos de susceptibilidade para o agente da pitiose foram realizados com antifúngicos e baseados no documento M38-A2 (PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2008).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Pythium insidiosum*

O primeiro isolamento de *Pythium insidiosum* foi realizado em 1901 por Haan & Hoogkamer, a partir de granulomas subcutâneos de equinos, mas os autores não conseguiram classificar o agente, sendo que ele foi identificado como *Hyphomyces destruens* em 1961 (MENDOZA et al., 1996). O oomiceto passou a ser chamado de *Pythium insidiosum* somente em 1989 (MENDOZA & MARIN, 1989). Baseado na classificação descrita por Alexopoulos (1996), fundamentado em filogenia e em análises moleculares, os organismos antes classificados como fungos estão divididos em três reinos: Fungi, Stramenopila e Protista. O agente etiológico da pitiose pertence ao Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e espécie *insidiosum* (MONTEIRO, 1999; LEAL, 1999).

A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos se deve a algumas diferenças fenotípicas e genotípicas. A quitina está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, sendo os componentes predominantes celulose e  $\beta$ -glucana (HENDRIX, 1964). Os oomicetos também diferem dos fungos por não sintetizarem os esteróides da membrana celular, incorporados do ambiente sem serem produzidos. Os esteróides tem papel na produção de estruturas sexuadas *in vitro*, não sendo necessários para o desenvolvimento miceliano (GROOTERS, 2003).

O gênero *Pythium*, caracteriza-se, ainda, pela produção de zoósporos biflagelados na reprodução assexuada, reprodução sexuada oogâmica, presença de talo diplóide, mitocôndria com crista tubular e características moleculares e bioquímicas próprias, como uma rota alternativa para síntese de lisina. Apresenta mais de 120 espécies, mas apenas *P. insidiosum* é conhecido como patógeno de animais e humanos. Para identificação destas espécies são necessárias avaliações das características morfológicas dos zoosporângios, zoósporos, oogônias e anterídios (ALEXOPOULOS et al., 1996; MOORE-LANDECKER, 1996).

Alexopoulos et al. (1996) e Moore-Landecker (1996) afirmaram que para a realização da identificação de *P. insidiosum* seria necessária além da observação de zoosporângios, zoósporos, oogônia e anterídio, também a obtenção de zoósporos em laboratório. A técnica de zoosporogênese em meio líquido foi descrita por Mendoza & Prendas (1988) e Pereira et al. (2007). A obtenção das estruturas infectantes é importante para a realização de estudos *in vitro* de suscetibilidade a drogas, reprodução da enfermidade em coelhos pela inoculação subcutânea de zoósporos produzidos *in vitro* (MILLER & CAMPBELL, 1983; SANTURIO et al., 2003) bem como para outros estudos envolvendo *P. insidiosum*.

Mendoza & Prendas (1988) e Pereira et al. (2008) relatam que o protocolo para indução de zoosporogênese *in vitro* deve se basear em alguns aspectos: parasitismo de fragmentos de grama em um meio pobre em nutrientes, seguido da incubação em um meio de indução para zoosporogênese, contendo íons  $\text{Ca}^{2+}$  (cálcio),  $\text{Mg}^{2+}$  (magnésio) e  $\text{K}^+$  (potássio) com temperatura e pH adequados. A liberação dos zoósporos e a sua motilidade são influenciadas pelas concentrações de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  no meio de indução, sendo estes íons muito importantes na zoosporogênese (SHIPTON, 1987). Segundo Shipton (1987) e Mendoza & Prendas (1988), a quantidade de zoósporos produzidos é dependente do meio utilizado, para crescimento do *P. insidiosum*, antes do processo de indução da zoosporogênese.

## 2.2 Epidemiologia da pitiose

*P. insidiosum* se desenvolve em temperaturas de 30°C a 40°C, assim a doença ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, sendo descrita nas Américas, alguns países europeus e sudeste asiático (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996; MENDOZA et al., 1996). A fonte de infecção são os zoósporos ambientais, sem transmissão direta entre os indivíduos (MENDOZA et al., 1996). O diagnóstico presuntivo da pitiose é feito levando-se em consideração a epidemiologia, sinais clínicos e aspecto das lesões. O isolamento e identificação do agente são importantes para o diagnóstico definitivo, mas métodos sorológicos e moleculares possibilitam um diagnóstico mais precoce e preciso (SANTURIO et al., 2006). O diagnóstico



diferencial inclui habronemose, neoplasia, tecido de granulação exuberante e granulomas fúngicos e bacterianos (CHAFFIN et al., 1995).

Os mecanismos envolvidos na patogenia e na resposta imune dos hospedeiros ainda são pouco conhecidos, mas o desenvolvimento de técnicas mais eficientes para o diagnóstico e avaliação da resposta imune tem permitido avanços no conhecimento da resposta imunológica desencadeada e no desenvolvimento de imunoterápicos para o tratamento da doença (SANTURIO et al., 2006). Miller (1981) acredita que as hifas, mesmo sendo antigênicas, não são totalmente reconhecidas pelo hospedeiro, devido à inflamação e progressão da doença em equinos imunocompetentes, que sugerem um bloqueio ou atenuação da resposta imunológica. No possível mecanismo imunológico da pitiose equina, de acordo com o proposto por Mendoza et al. (1996), as hifas de *P. insidiosum* liberariam antígenos solúveis inicialmente, que estimulariam a produção de Imunoglobulina E (IgE). As IgEs se ligariam aos eosinófilos presentes na superfície das hifas, ativando mastócitos, que liberariam fatores quimiotáxicos para eosinófilos, sendo estes atraídos para o local de infecção. Os eosinófilos se ligariam nas IgEs presentes nas hifas e degranulariam, protegendo a hifa do restante do sistema imune.

As condições ambientais são fundamentais para o desenvolvimento do agente da pitiose. Sendo assim, Miller (1983) propôs um ciclo ecológico para o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa do *P. insidiosum*. Este se baseia em colonização de plantas aquáticas, servindo como substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo, que forma os zoosporângios, que em seu interior possuem zoósporos. Os zoósporos quando livres na água movimentam-se até encontrar outra planta ou animal para se encistar, emitindo um tubo germinativo, o qual dará origem a um novo micélio (MILLER & CAMPBELL, 1982). Estudos demonstraram a atração quimiotáxica de zoósporos por pelos, tecidos animal e vegetal, sendo atribuída a substâncias presentes nesses tecidos. Uma substância amorfa é liberada pelo zoósporo após o encistamento, produzida em resposta à quimiotaxia do hospedeiro e agindo como adesivo para ligar o zoósporo, permitindo a formação de tubo germinativo (MENDOZA et al., 1993). Essas observações sugerem que equinos em contato com águas contaminadas poderiam atrair os zoósporos, que germinariam a partir de uma pequena lesão presente na pele (MENDOZA et al., 1993; MILLER, 1983).

### 2.3 Manifestações clínicas de pitiose

Os equinos são a espécie mais atingida pela pitiose, sem predisposição de raça, sexo ou idade (FOIL, 1996; MENDOZA, 1986). A primeira descrição de pitiose equina ocorreu no Rio Grande do Sul por Santos & Londero (1974). Nestes animais, há desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, com a presença de massas necróticas semelhantes a corais com aspecto arenoso, denominadas *kunkers*. As lesões cutâneas são as mais comuns, principalmente nas extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toracoabdominal, provavelmente devido ao maior contato destas regiões com águas contaminadas com zoósporos (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996). As lesões apresentam evolução progressiva e são de difícil tratamento. Nas regiões afetadas, ocorre a formação de *sinus*, onde penetram os *kunkers* e de onde fluem secreções sanguinolentas ou purulentas. Os animais acometidos pela pitiose demonstram prurido intenso, levando muitas vezes à mutilação (MILLER & CAMPBELL, 1982; MEIRELLES et al., 1993; MENDOZA et al., 1993; MENDOZA & ALFARO, 1986).

Em equinos, a segunda forma de infecção mais relatada é a intestinal, ocasionando cólicas devido ao desenvolvimento de massas teciduais que ocasionam a diminuição do lúmen intestinal (LEAL et al., 1999). Outros tecidos também podem ser atingidos secundariamente às lesões cutâneas, incluindo lesões ósseas adjacentes à lesão primária e lesões em linfonodos regionais, que podem apresentar metástases com presença de *kunkers* ou apenas aumentados e edemaciados (MILLER & CAMPBELL, 1984).

Os cães estão entre as espécies mais afetadas após os equinos. Na maioria dos casos a doença afeta o trato gastrointestinal (FOIL et al., 1984; HOWERTH et al., 1989), mas há relatos de pitiose cutânea (DYKSTRA et al., 1999), prostática (JAEGER et al., 2002) e disseminada (RIVIERRE et al., 2005). Nos casos em que há comprometimento gastrointestinal, ocorre emagrecimento progressivo, dor abdominal, inapetência, diarreia, vômito e presença de massa abdominal palpável (HELMANN & OLIVER, 1999; MENDOZA et al., 2003). Os cães afetados são normalmente oriundos de regiões rurais ou que estiveram em locais alagados (FOIL et al., 1984).

A pitiose bovina é menos frequente, havendo um relato nos EUA (MILLER et al., 1985) e no Pantanal Sul-Matogrossense (SANTURIO et al., 1998), sendo que no segundo caso ocorreu cura espontânea. Nestes relatos ocorreram lesões cutâneas com ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada, principalmente nos membros.

A pitiose em gatos é rara, com poucos relatos na literatura. Um relato refere-se a uma infecção nasal e retrobulbar, sem comprometimento de órgãos internos (BISSONNETTE et al., 1991). Há relatos de pitiose em espécies não-domésticas como urso, jaguar, camelo e tigre (GROOTERS, 2003; CAMUS et al., 2004; WELLEHAN et al., 2004; BUERGELT et al., 2006). Recentemente foi descrito um caso de pitiose em uma ave migratória (PESAVENTO et al., 2008).

Em humanos, as infecções ocorrem como oftálmicas, subcutâneas e sistêmica, geralmente associadas com pacientes tailandeses, com casos esporádicos nos EUA, Austrália, Haiti e Nova Zelândia. As lesões cursam com a formação de granulomas, arterites, trombozes, gangrenas e ceratites nas afecções oculares. A importância da doença na Tailândia está ligada a alta prevalência da alfa e beta-talassemia na população e a presença de grandes áreas alagadiças utilizadas na agricultura (IMWIDTHAYA, 1994; KRAJAEJUN et al., 2006). No Brasil, há um relato da doença em um homem, com úlceras no membro inferior, após contato com águas com zoósporos (MARQUES et al., 2006).

## **2.4 Tratamento da pitiose**

A composição da parede celular e a ausência de ergosterol na membrana citoplasmática dos oomicetos são fatores que dificultam o tratamento da pitiose por terapias antifúngicas convencionais. Devido ao fato da maioria dos antifúngicos terem como mecanismo de ação a inibição da síntese de ergosterol, as drogas antifúngicas tradicionais são ineficientes contra *P. insidiosum* (SANTURIO et al., 2006; GROOTERS, 2003).

O tratamento da pitiose em equinos mais utilizado é o cirúrgico e requer retirada de toda área afetada, com margem de segurança para evitar recidivas. Este tratamento é dificultado pelas

estruturas anatômicas envolvidas, principalmente nos membros, uma das regiões mais afetadas (MILLER, 1981).

Os resultados obtidos com o emprego de agentes antifúngicos são controversos, tanto no tratamento clínico quanto nos testes de sensibilidade *in vitro* (SEKHON et al., 1992). Com relação ao tratamento químico, as drogas mais utilizadas até o momento foram a anfotericina B, cetoconazole, miconazole, fluconazole e itraconazole, além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e sódio (MILLER, 1981). McMullan et al. (1977) obtiveram 50% de eficiência associando a remoção cirúrgica com tratamento com anfotericina B, 30% apenas com anfotericina B e 20% não responderam aos tratamentos. Estudos recentes envolvendo suscetibilidade de *P. insidiosum* a agentes antifúngicos demonstraram CIMs de 8 a 64 µg/ml para caspofungina (PEREIRA et al., 2007), 16 a 32 µg/ml para itraconazole e voriconazol, 4 a 32 µg/ml miconazol, 16 a 64 µg/ml para cetoconazol, 32 a 64 µg/ml para fluconazol (CAVALHEIRO et al., 2009a) e 8 a 32 µg/ml para anfotericina B (CAVALHERO et al., 2009b).

Gonzales et al. (1979) e Chaffin et al. (1992) obtiveram resposta ao tratamento com iodeto de potássio associado a cirurgia, entretanto, Meireles et al. (1993) não obtiveram sucesso com este tipo de tratamento. Estudos também relataram o uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio como tratamento suplementar após a remoção cirúrgica de lesões de pitiose equina (SEDRISH et al., 1997).

Uma alternativa para o tratamento de equinos acometidos pela pitiose foi proposto por Miller (1981) que desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do agente. Nas décadas de 80 e 90 vários autores utilizaram a imunoterapia, fazendo modificações na técnica original (MENDOZA & ALFARO, 1986). Em 1998 foi descrita a cura, após o uso de imunoterapia, em um menino portador de talassemia infectado por *P. insidiosum*, sendo o imunoterápico utilizado após o insucesso com o tratamento a base de anfotericina B, iodetos, cetoconazole e cirurgia (THITITHANYANONT et al., 1998). No Brasil, o teste de eficiência do imunoterápico PITIUM-VAC<sup>®</sup> para o tratamento da pitiose equina variou de 50% a 83,3%, sendo produzido a partir de culturas de *P. insidiosum*, baseando-se na metodologia descrita por Miller (MONTEIRO, 1999). A cura induzida pela imunoterapia não está totalmente esclarecida. Acredita-se que antígenos citoplasmáticos contidos no imunoterápico induza o sistema imune à resposta humoral e celular, favorecendo a cura da doença.

O sucesso dos diferentes tratamentos é variável e influenciado pelo tamanho e duração da lesão, idade e estado nutricional do animal. Shenep et al. (1998) afirma que a cura farmacológica para pitiose é possível, sendo necessária a realização de mais testes de susceptibilidade *in vitro*.

## 2.5 Fármacos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são importantes antimicrobianos descobertos na década de 1940. Os estudos que culminaram com o seu descobrimento iniciaram em 1939, e em 1943 Waksman et al. isolaram uma cepa de *Streptomyces griseus*, que produzia uma substância que inibia o crescimento do bacilo da tuberculose e de diversos micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (TAVARES, 2001). Em 1944, a estreptomicina foi isolada, e após este fato, foi descoberta uma série de novas substâncias com potencial antibacteriano derivadas dos actinomicetos, além dos aminoglicosídeos semi-sintéticos (GILBERT, 1995). A molécula dos aminoglicosídeos é constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central (OLIVEIRA et al., 2006).

A atividade antimicrobiana dos aminoglicosídeos ocorre principalmente em meio aeróbio e em pH alcalino e a farmacocinética é semelhante para todos os fármacos do grupo, sendo pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal. São insolúveis em lipídios, tendo dificuldade de atravessar as membranas biológicas que não possuam um mecanismo de transporte eficiente, e por isso sua concentração em secreções e nos tecidos se torna reduzida. O efeito bactericida é exercido por ligação ao ribossomo bacteriano. Uma vez no interior da célula, os aminoglicosídeos se ligam à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, diminuindo a síntese protéica, pois ocasionam a leitura incorreta do RNA mensageiro (RNAm) e alteração no funcionamento da membrana celular, levando à saída de constituintes essenciais à célula e conseqüente morte da bactéria (OLIVEIRA et al., 2006).

As concentrações séricas terapêuticas estão próximas das doses tóxicas (OLIVEIRA et al., 2006). Para gentamicina e tobramicina, o risco de ototoxicidade e nefrotoxicidade é aumentado se os picos de concentração plasmática forem mantidos acima de 12 a 14 µg/ml, ou se os níveis mínimos de concentração plasmática excederem 2 µg/ml, enquanto que as concentrações

plasmáticas terapêuticas para pacientes tratados para infecções graves atingem um pico de 6 a 8 µg/ml e níveis mínimos de 0,5 a 1,5 µg/ml. Para amicacina, picos plasmáticos acima de 32 a 34 µg/ml ou níveis mínimos maiores que 10 µg/ml são associados com altos riscos de ototoxicidade e nefrotoxicidade, enquanto que as concentrações plasmáticas terapêuticas atingem um pico de 20 a 25 µg/ml e níveis mínimos de 1 a 4 µg/ml (RODVALD et al., 1988).

Os seus efeitos tóxicos mais importantes incluem: nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular (GILBERT, 1995). Vários estudos foram realizados na tentativa de elucidar o desenvolvimento da nefrotoxicidade, mas os mecanismos através dos quais os aminoglicosídeos alteram a filtração glomerular não são ainda totalmente esclarecidos. Os possíveis mecanismos seriam: através de hormônios vasoconstritores (SCHOR et al., 1981); liberação de fator agregador de plaquetas (DOS SANTOS et al., 1991); deposição de restos celulares obstruindo néfrons individuais (NEUGARTEN et al., 1983); diminuição na superfície e alteração na permeabilidade glomerular, com diminuição do coeficiente de ultrafiltração glomerular (BAYLIS et al., 1977).

Frente a micro-organismos eucariotos, existem relatos de fármacos da classe com potencial inibitório, como paromomicina (BERMAN, 1998; SWEETMAN, 2005; LEE et al., 2005), gentamicina (SHAHAN & PORE, 1991), estreptomicina (MCMEEKIN & MENDOZA, 2000; MCMEEKIN, 1978; MCMEEKIN, 197; BEAKES & GAY, 1980; MULLER et al., 1954; SWIEZYNSKI & JANKWOWSKA, 1970; SHATTOCK & SHA, 1975), neomicina e ribostamicina (LEE et al., 2005). Alguns estudos relataram que pode ser possível os oomicetos representarem um grupo com um certo grau de sensibilidade procariótica à ação de aminoglicosídeos (LEE et al., 2005).

Em medicina veterinária e na produção animal, os aminoglicosídeos são utilizados no tratamento de infecções bacterianas, como por exemplo enterites bacterianas e mastites. São exemplos de fármacos utilizados para estes fins a gentamicina, a neomicina e a estreptomicina (STEAD, 2000).

### 2.5.1 Paromomicina

A paromomicina, ou aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus* (COFFEY et al., 1959). O seu mecanismo de ação está ligado à inibição de síntese protéica, através de ligação às proteínas ribossômicas, interferindo na leitura do RNAm e no complexo de formação de peptídeos, levando à ruptura dos polissomos em monossomos não funcionais. Difere da neomicina B somente na substituição de uma OH por uma amina (BERMAN, 1998). Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 1.

Este fármaco possui um amplo espectro de ação contra bactérias, incluindo atividade contra protozoários e cestódios, o que não é observado por outros aminoglicosídeos (BERMAN, 1998; SWEETMAN, 2005). A administração de paromomicina oral tem sido recomendada para o tratamento de teníase e amebíase (BERMAN, 1998). Possui ainda ação leishmanicida comprovada, sendo que atualmente se encontra em fase de desenvolvimento avançado para o tratamento da leishmaniose visceral (SUNDAR et al., 2007).

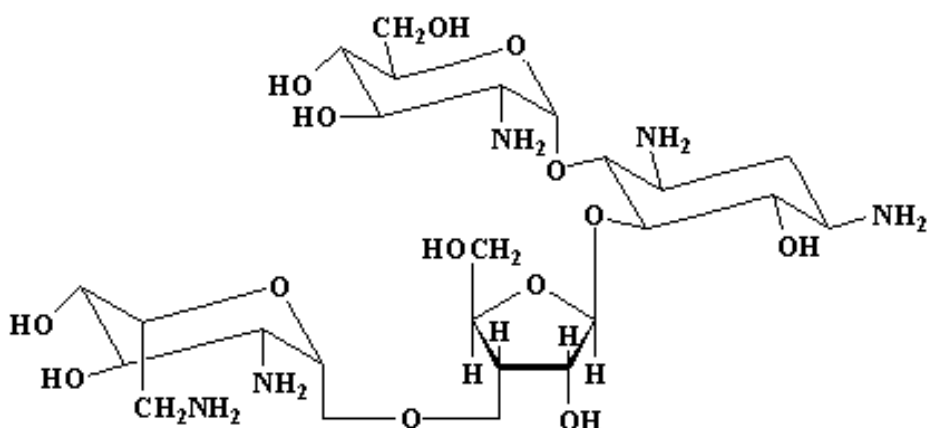


Figura 1 – Estrutura química da paromomicina.

### 2.5.2 Gentamicina

Em 1963, Weinstein e seus colaboradores isolaram uma nova substância de largo espectro antimicrobiano, a gentamicina, a partir de duas espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Micromonospora* (WEINSTEIN, 1963). Produzido por fermentação de *Micromonospora purpurea* ou de *M. echinospora*, a gentamicina tem como componentes moleculares pseudo-trissacarídeos, contendo garosamina e purpurosamina ligadas glicosidicamente à 2-deoxiestreptamina. Quanto à posição desta ligação, a gentamicina apresenta uma estrutura de 2-deoxiestreptamina 4,6-dissubstituída (SOUSA, 2005), podendo ser visualizada na Figura 2.

Este fármaco é ativo contra *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Tem moderada atividade frente à *Streptococcus* spp., e em associação com a penicilina tem uma ação sinérgica contra *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* (WEINSTEIN, 1967).

A sua eliminação ocorre por via renal, através de filtração glomerular, atingindo elevadas concentrações urinárias, sem sofrer alterações metabólicas (SOUSA, 2005), assim estas substâncias químicas podem produzir graves efeitos tóxicos, principalmente ototoxicidade e nefrotoxicidade, relacionados com a dose (RANG et al., 2004).

Por ser um antimicrobiano de largo espectro, a gentamicina é usada em várias situações no tratamento de infecções sistêmicas graves, provocadas por bacilos Gram-negativos, podendo ser usada isoladamente ou em associação a outros antimicrobianos (SOUSA, 2005). Geralmente é um dos fármacos de primeira escolha no combate às infecções nosocomiais graves causadas por Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa* (EDSON, 1999). Devido à sua larga utilização na terapêutica, houve um aumento no número de estirpes bacterianas resistentes a este composto químico, principalmente no que se refere às infecções hospitalares (SOUSA, 2005). Com relação a eucariotos, foi demonstrada a suscetibilidade, *in vitro*, de micro-organismos do gênero *Prototheca* em concentrações inferiores às concentrações plasmáticas (SHAHAN & PORE, 1991).



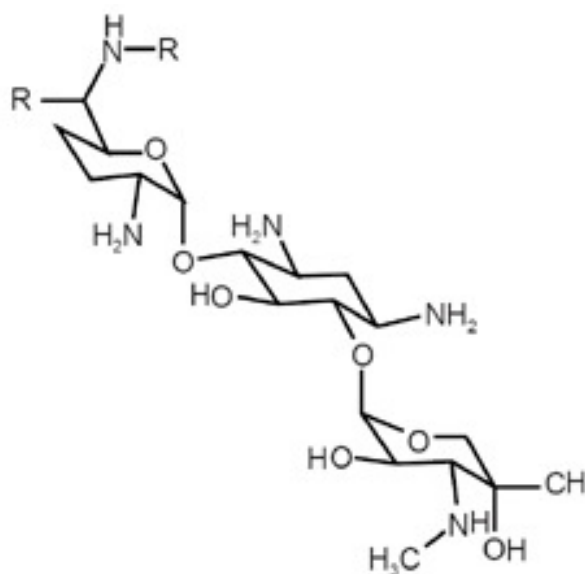


Figura 2 – Estrutura química da gentamicina.

### 2.5.3 Neomicina

A neomicina é um aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces fradiae*. Demonstra atividade bactericida frente à maioria dos bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, além de muitos cocos Gram-positivos (PRESCOTT et al., 2000).

A neomicina é formulada isoladamente ou em combinação com outros agentes antimicrobianos, tais como: lincomicina, penicilina, cefalosporinas e algumas sulfonamidas, para administração oral, tópica, intramamária ou parenteral. Este fármaco tem sido utilizado em medicina veterinária, no tratamento de infecções respiratórias e intestinais, lesões de pele e mastites (PRESCOTT et al., 2000). Suas propriedades farmacocinéticas se devem a estrutura polar, com baixa difusão nas membranas e não demonstrando significativa absorção pelo trato gastrointestinal, sendo os bezerros jovens uma exceção (ASCHBACHER & FEIL, 1994). Sua excreção é fecal após administrações orais, e urinária após administrações parenterais.

(PRESCOTT et al., 2000; WHO, 1995). A estrutura química da neomicina pode ser visualizada na Figura 3.

Oralmente, é utilizada no tratamento de enterites, incluindo salmonelose e diarreia por *Escherichia coli*, sendo também utilizada na forma intramuscular frente às infecções do trato respiratório, como pneumonia por *Rhodococcus equi*, e em administrações intrauterinas no combate às infecções. Formulações tópicas são utilizadas no combate às infecções oculares, auditivas e ferimentos (PRESCOTT et al., 2000).

Devido à utilização de formulações injetáveis estarem associadas à ototoxicidade e nefrotoxicidade, sua indicação usualmente é limitada ao tratamento alternativo de infecções graves por micro-organismos Gram-negativos resistentes à terapia tradicional. Em alguns países com EUA, Canadá e África do Sul, seu uso não é permitido em animais de produção (PRESCOTT et al., 2000).

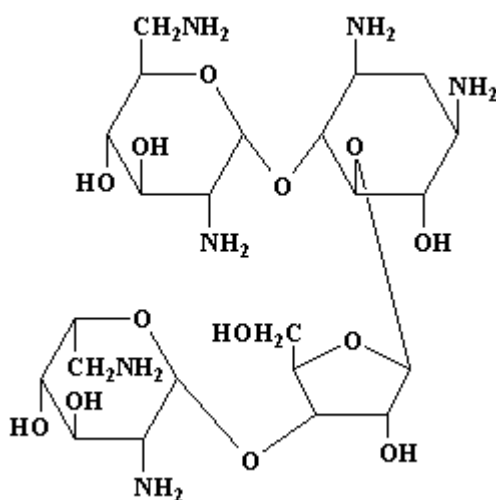


Figura 3 – Estrutura química da neomicina.

#### 2.5.4 Estreptomicina

A estreptomicina foi isolada de uma cepa de *Streptomyces griseus*, por Waksman et al., em 1944 (SILVA, 1994). Sua estrutura consiste em dois aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica ao núcleo de estreptose, que se encontra em posição central na estrutura química (HARDMAN et al., 1996), podendo ser visualizada na Figura 4.

A estreptomicina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, mas possui boa capacidade de distribuição pelos tecidos e líquidos orgânicos, sendo capaz de atravessar a placenta e atingindo no sangue fetal, concentração aproximadamente igual à metade da concentração plasmática da mãe. Quando administrada por via oral, é eliminada quase totalmente por via fecal, sob a forma de substância ativa (TRABULSI & SOARES, 1998).

O sulfato de estreptomicina é ativo contra vários micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, bem como para o bacilo da tuberculose. Atua inibindo a síntese protéica bacteriana sem burlar a leitura do código genético. As mutações que conferem resistência à estreptomicina são frequentes, sendo que desde sua descoberta já se observava a presença de bacilos naturalmente resistentes (TRABULSI & SOARES, 1998). Foi um dos primeiros fármacos a ser utilizado para a terapia da leptospirose e é considerada, até hoje, uma das melhores opções de tratamento (GIRIO et al., 2005). Nos Estados Unidos e no Reino Unido, devido à sua toxicidade, a estreptomicina é atualmente a droga suplementar de primeira linha menos prescrita, porém nos países em desenvolvimento ainda é muito utilizada (RANG et al., 2001). Os pacientes em uso de estreptomicina devem ser monitorados cuidadosamente quanto aos efeitos adversos auditivos e vestibulares (GLASHAN, 1996).

Com relação a *P. insidiosum*, foi verificado *in vitro*, que isolados de humanos em meio de cultura podem ter seu crescimento inibido, não afetado ou estimulado quando expostos a estreptomicina (MCMEEKIN & MENDOZA, 2000).

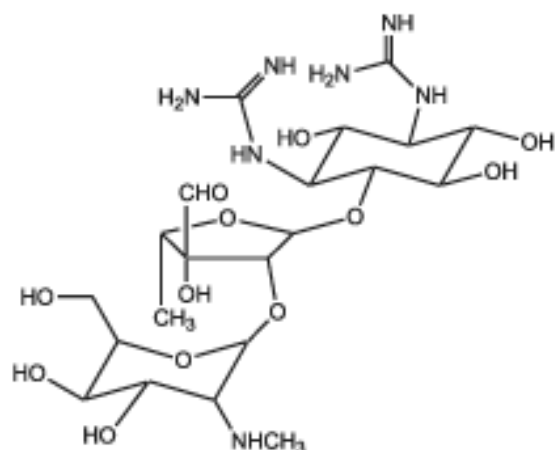


Figura 4 – Estrutura química da estreptomicina.

## 2.6 Grupo das Glicilciclinas

Após a descoberta da minociclina em 1972, um longo tempo se passou sem que novas tetraciclinas fossem descobertas, até que em 1993 as glicilciclinas foram sintetizadas. Estes novos agentes possuem largo espectro de ação frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes às tetraciclinas (SUM et al., 1998). As glicilciclinas são análogos semissintéticos das tetraciclinas, que se ligam cinco vezes mais fortemente ao ribossomo do que tetraciclina e minociclina, contornando um mecanismo de ação de resistência às tetraciclinas que está ligado à proteção ribossomal (KASBEKAR et al., 2006).

A tigeciclina é a primeira droga da classe das glicilciclinas a estar disponibilizada para uso clínico. Outras glicilciclinas já são conhecidas, mas ainda estão em distintas fases de investigação clínica (GUAY, 2004; PETERSON, 2008).

### 2.6.1 Tigeciclina

A tigeciclina é uma glicilciclina derivada da minociclina, sintetizada através de modificações efetuadas na estrutura química da minociclina, que proporcionam o aumento no espectro de ação *in vitro* e a prevenção dos mecanismos de resistência referentes à classe das tetraciclina. Sua utilização clínica foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em junho de 2005, sendo que sua aprovação nos EUA inclui sua utilização para infecções de pele e nas infecções complicadas das partes moles e intra-abdominais (ELLIS-GROSSE et al., 2005; BABINCHAK et al., 2005).

A tigeciclina atua por ligação a fração 30S do ribossomo, inibindo a síntese protéica mesmo na presença de mecanismos de proteção ribossomal e de efluxo. Além destes, outros mecanismos de resistência bacteriana não atuam frente à tigeciclina, como degradação enzimática do fármaco e mutações na DNA girase (GUAY, 2004; PETERSON, 2008). Sua propriedades antimicrobianas são similares as da tetraciclina, mas ela ainda não é afetada pela resistência (PETERSEN et al., 1999) devido à substituição de um grupo N-alkil-glicilamido no anel D na nona posição (PANKEY, 2005). Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 5. Os efeitos adversos ao uso da tigeciclina também são semelhantes aos das tetraciclina.

Além do amplo espectro de ação, a tigeciclina possui alto volume de distribuição pelos diversos compartimentos orgânicos, e não afeta a atividade do sistema enzimático citocromo P450. Tigeciclina não é afetada pelas beta-lactamases, presentes principalmente em boa parcela de cepas de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Sua utilização é contra-indicada em presença de *Pseudomonas* spp., mostrando-se ineficiente contra esta bactéria (PANKEY, 2005).

A grande maioria das bactérias Gram-positivas possuem elevada susceptibilidade *in vitro* à tigeciclina, uma vez que ela se mostra ativa contra praticamente todas as cepas (98%-100%) de estafilococos sensíveis e resistentes à meticilina e enterococos resistentes à vancomicina. Frente a bacilos Gram-negativos é altamente ativa contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Serratia marcescens*. Possui atividade inibitória frente a anaeróbios, inclusive contra o *Bacteroides fragilis* (PETERSON, 2008; LOPES, 2006; HOBAN et al., 2005).

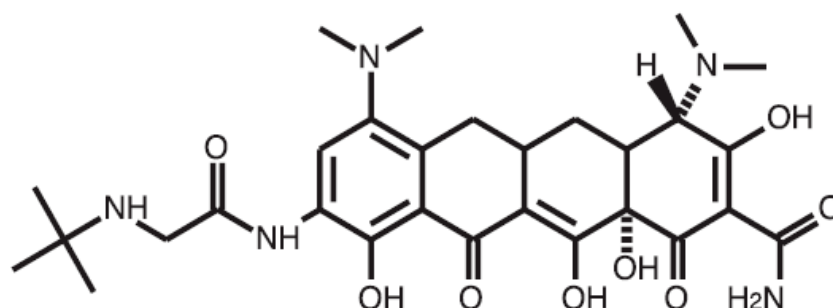


Figura5 – Estrutura química da tigeciclina.

## 2.7 Uso de antimicrobianos frente aos organismos fúngicos

Diversos estudos relatam atividade *in vitro* de drogas comumente empregadas contra agentes bacterianos frente aos agentes fúngicos. As quinolonas atuam na inibição da DNA girase bacteriana, e se acredita que esta inibição seja inespecífica, pois estudos tem demonstrado sua ação em agentes microbianos não bacterianos. Shen et al. (1992) relatam que as quinolonas podem ter efeito inibitório na topoisomerase II fúngica. A DNA girase é um tipo de topoisomerase II, presente em células eucarióticas e procarióticas (DYKSTRA et al., 1994; FOSTEL et al., 1996; GELLERT et al., 1977; SHEN & FOSTEL, 1994; SUGINO et al., 1977). Há demonstrações de algumas quinolonas potencializando os efeitos de agentes antifúngicos (PETROU & ROGERS, 1988; VANGDAL & BERGAN, 1984; WALSH et al., 1983; VENTURINI et al., 2011). A fluoroquinolona DU-6859a, não possui atividade antifúngica isolada (SATO et al., 1992), mas atua sinergicamente com anfotericina B e fluconazol. Isto ocorre possivelmente pela entrada de DU-6859a na célula, após danos à membrana por ação da anfotericina B, permitindo a ação intracelular da quinolona, ocorrendo inibição de topoisomerase II dos fungos (ELSEA et al., 1982).

Anfotericina B demonstra maior eficácia *in vitro*, contra coccidioidomicose, quando associada à tetraciclina (HUPPERT et al., 1974). Os análogos de tetraciclina, flucitosina e rifampicina também parecem aumentar a atividade *in vitro* de anfotericina B frente à *Aspergillus*

spp. (HUGHES et al., 1984). A anfotericina B se liga aos esteróis presentes na membrana celular, aumentando sua permeabilidade, com conseqüente entrada e ação da flucitosina e rifampina na síntese de RNA e de proteínas (MEDOFF et al., 1983). Anfotericina B e rifampicina são sinérgicos *in vitro* atuando frente a *Candida* spp. (BEGGS et al., 1976; EDWARDS et al., 1980), *Histoplasma capsulatum* (KOBAYASHI et al., 1972), *Coccidioides immitis* (RIFKIND et al., 1974), *Saccharomyces cerevisiae* (MEDOFF et al., 1972), *Aspergillus* spp. (CLANCY et al., 1998) e *Fusarium* spp. (CLANCY et al., 1998; VENTURINI et al., 2011; SPADER et al., 2011). Em estudo similar, Lew et al. (1977) verificaram o mesmo sinergismo entre anfotericina B e minociclina, frente a *Candida albicans*.

Foi estudada atividade fungicida sinérgica, *in vitro*, entre anfotericina B e o inibidor de síntese protéica azitromicina, frente a *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. A azitromicina, que não tem atividade antifúngica intrínseca, aumenta a atividade da anfotericina B. O uso de anfotericina B gera danos à membrana celular fúngica, permitindo a entrada de azitromicina, que exerce sua atividade antimicrobiana por inibição da síntese protéica (NGUYEN & CLANCY, 1997; VENTURINI et al., 2001).

A polimixina B é um antimicrobiano peptídico que já demonstrou ação inibitória contra *Saccharomyces cerevisiae*, provocando danos às membranas citoplasmáticas e vacuolares (SCHWARZ et al., 1972), o que sugere que sua atividade antimicrobiana se estende aos eucariotos. Bem-Ami et al. (2010) verificaram que a polimixina E (colistina) possui atividade inibitória *in vitro* frente a *Mucorales*.

Cavalheiro et al. (2009) avaliaram, frente a *Pythium insidiosum*, a atividade *in vitro* de terbinafina em combinação com anfotericina B, metronidazol, rifampicina, ibuprofeno ou fluvastatina, verificando sinergismo na combinação terbinafina e anfotericina B e antagonismo quando combinados terbinafina com fluvastatina ou rifampicina. Devido à ausência de ergosterol na membrana celular de *P. insidiosum*, outro mecanismo adicional deve estar envolvido na ação de anfotericina B (CAVALHEIRO et al., 2009b).

## 2.8 Susceptibilidade da família Pythiaceae a antibacterianos

O gênero *Pythium* difere dos fungos também por já terem demonstrado sensibilidade a fármacos atuantes na unidade 70S dos ribossomos, como tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina e eritromicina (LEARY et al., 1982; MARCHANT & SMITH, 1968; RAWN & VAN ETTEN, 1978; TSAO, 1970). Alguns desses antimicrobianos podem ter mais de um modo de ação em micro-organismos pythiaceos (RAWN & VAN ETTEN, 1978), sendo que estes são sensíveis a concentrações relativamente baixas de alguns destes fármacos, responsáveis por inibição da síntese proteica *in vivo* em procariotos (HENDRIX, 1974; TSAO, 1970).

A síntese de citocromos requer a produção coordenada de peptídeos em ribossomos citoplasmáticos e mitocondriais (SCHATZ & MASON, 1974). Marchant & Smith (1968) relataram diminuição de alguns citocromos em isolados de *Pythium ultimum*, tratados com cloranfenicol. Carnes & Leary (1977) reportaram que a incorporação de aminoácidos em proteínas de mitocôndrias isoladas de *Phytophthora palmivora* foi inibida por cloranfenicol, sugerindo que o este antimicrobiano atua no ribossomo mitocondrial.

O sistema de proteínas mitocondriais de eucariotos possui características procarióticas, diferenciando-as da proteína citoplasmática. Este fato diferencia a incorporação de aminoácidos mitocondriais, que pode ser inibida por baixas concentrações de cloranfenicol (SCHATZ & MASON, 1974; PESTKA, 1975; LAMB et al., 1968; GRIVELL, 1967; DE VRIE et al., 1971).

Com algumas exceções, relatos de sensibilidade de oomicetos fitopatogênicos da família Pythiaceae aos antimicrobianos tem sido relatados apenas pela inibição do crescimento (TSAO, 1970). Foi desenvolvido um estudo de detecção dos efeitos de agentes antimicrobianos nestes fungos, com tetraciclina e cloranfenicol, onde se evidenciou inibição da incorporação de aminoácidos em um isolado de *P. ultimum* (RAWN & VAN ETTEN, 1977). Rawn & Van Etten (1978) verificaram ação inibitória de tetraciclina, eritromicina, ciclohexamida e cloranfenicol incorporados a meio de cultura em caldo, contra *P. ultimum*.

Ocorre disparidade do transporte de aminoácidos, com o uso de tetraciclina e cloranfenicol, em pelo menos uma região de ação dos antimicrobianos. Mas o local de efeito inibitório direto na síntese proteica parecem ser os ribossomos citoplasmáticos ou mitocondriais. O sistema de síntese de proteína mitocondrial eucariótica é geralmente sensível às baixas



concentrações destas drogas *in vitro*, mas estes ribossomos produzem apenas uma pequena porcentagem da massa de proteína celular, sendo o grande volume produzido pelo sistema de síntese de proteína citoplasmático (SCHATZ & MASON, 1974). A tetraciclina também afetaria diretamente o sistema de síntese proteica no citoplasma, sendo consistente com relatos de inibição *in vitro* do sistema citoplasmático pela tetraciclina (PESTKA, 1971). Loreto et al. (2011) verificaram a ação inibitória *in vitro* de antimicrobianos macrolídeos e tetraciclinas frente a *P. insidiosum*.

Oomicetos fitopatogênicos do gênero *Pythium*, não demonstram sensibilidade a antimicrobianos poliênicos na ausência de esteróis, podendo tornar-se sensível em meios contendo esteróis (ELIOTT, 1977; LAMPEN, 1966; ORCI et al., 1980). Esta conexão reflete o papel dos esteróis na estrutura e na função da membrana celular, podendo ter papel na permeabilidade. Nas diversas vias nas quais os esteróis possuem ação contra estes oomicetos, foi investigada a possibilidade de que os mesmos poderiam modificar a sensibilidade das espécies de *Pythium* para estes fármacos que atuam nos ribossomos. Rawn & Schwarz (1987) demonstraram atividade inibitória, com diminuição do crescimento radial do micélio, de *Pythium* spp. utilizando tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol, quando adicionados ao meio de cultura, verificando a diminuição da atividade inibitória com o acréscimo de colesterol nos meios de cultura.

Patógenos de plantas, dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium* demonstraram sensibilidade aos aminoglicosídeos neomicina, paromomicina, ribostamicina e estreptomicina, *in vitro* e *in vivo*, com concentrações inibitórias mínimas menores que 10 mg/L. Paromomicina foi o fármaco que apresentou melhores resultados e todos antimicrobianos demonstraram ação seletiva entre as diferentes espécies de *Phytophthora*. É possível que os oomicetos representem um grupo com sensibilidade procariótica aos aminoglicosídeos (LEE et al., 2005).

Estudos *in vitro* com *P. insidiosum* relatam que esta espécie pode manifestar diferentes graus de suscetibilidade frente à estreptomicina, este fato pode ser devido a diferença de material genético contido em distintas porções do micélio (MCMEEKIN & MENDOZA, 2000). McMeekin (1978) demonstrou que isolados de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium irregulare*, patógenos de plantas, foram inibidos por estreptomicina, enquanto que outro isolado de *P. aphanidermatum* foi estimulado na concentração de 100 µg/ml de estreptomicina, sendo inibido quando esta concentração foi aumentada para 200 µg/ml. Entretanto, a inibição do crescimento

de *P. aphanidermatum* e *Peronospora parasitica* por estreptomicina foi revertida por cátions de cálcio e manganês (MCMEEKIN, 1973).

A estreptomicina também inibiu o crescimento e esporulação de espécies do gênero fúngico *Saprolegnia* evidenciando variações de sensibilidade, onde o cálcio pode minimizar este efeito. Os efeitos observados foram de condensação do citoplasma e segmentos de hifas lisadas, mudanças no retículo endoplasmático, mitocôndria e núcleo (BEAKES & GAY, 1980). O crescimento de isolados de *Phytophthora infestans* também foi reduzido pela estreptomicina (MULLER et al., 1954; SWIEZYNSKI & JANKWOWSKA, 1970; SHATTOCK & SHA, 1975), inibindo a liberação dos zoósporos e a germinação dos esporângios. O efeito exercido foi fungistático ou fungicida, dependendo da concentração testada e da duração da incubação (ROOKE & SHATTO, 1983).

## **2.9 Testes para avaliação de susceptibilidade *in vitro* para *Pythium insidiosum***

A padronização do teste de susceptibilidade aos antifúngicos pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ocorreu após 15 anos de trabalhos colaborativos. Em 2008, foi publicado o documento M38-A2 (CLSI, 2008), que padroniza os ensaios microbiológicos para avaliação da susceptibilidade de hifomicetos.

Há poucos estudos de susceptibilidade para *P. insidiosum* e não há técnicas padronizadas para estudos *in vitro* para este oomiceto. Os estudos se baseiam no documento M38-A2 (CLSI, 2008) para os testes de susceptibilidade. O inóculo padronizado, obtido pela contagem de zoósporos, é o que mais se aplica aos estudos com este oomiceto (PEREIRA et al., 2007). O ajuste do inóculo por espectrofotometria não pode ser aplicado para suspensões de zoósporos, pois eles não produzem turbidez (PEREIRA et al., 2007). Espinel-Ingroff et al. (1997) enfatizou que a preparação do inóculo com suspensões de hifas não é adequado para *P. insidiosum*, embora outros autores tenham utilizado suspensões de hifas ajustadas por espectrofotometria como inóculo (SEKHON et al., 1992).

### 3 OBJETIVOS

- a) Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de 22 cepas isoladas de lesões de animais com pitiose e as cepas padrão ATCC 58637 e CBS 101555 de *Pythium insidiosum* frente a: paromomicina, gentamicina, neomicina, estreptomomicina e tigeciclina
- b) Determinar as concentrações inibitórias mínimas e concentrações fungicidas mínimas dos fármacos testados, através do método de microdiluição em caldo.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Local do experimento**

As avaliações foram desenvolvidas no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

### **4.2 Amostras de *P. insidiosum***

Foram utilizados neste estudo vinte e dois isolados de *P. insidiosum*, obtidos através de material de lesão de animais enviadas ao Laboratório de Pesquisas Micológicas, e as cepas padrão ATCC 58637 e CBS 101555. As cepas foram identificadas molecularmente por ensaios de Nested-PCR conforme Botton et al (2011), sendo mantidas na coleção de micro-organismos do laboratório cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura meio mínimo (MM). A distribuição das amostras pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos 24 isolados de *P. insidiosum* classificadas pela espécie em que foram isoladas e origem.

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	
<b>ATCC 58637</b>	Equino	Costa Rica	
<b>CBS 101555</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 120</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 121</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 123</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 126</b>	Equino	Mato Grosso do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 135</b>	Equino	Mato Grosso do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 137</b>	Equino	Mato Grosso do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 138</b>	Equino	Mato Grosso do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 142</b>	Equino	Mato Grosso do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 143</b>	Equino	Mato Grosso do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 156</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 178</b>	Equino	Mato Grosso do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 187</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 198</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 210</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 219</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 223</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 227</b>	Equino	Mato Grosso do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 232</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 247</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 253</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 254</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil
<b>LAPEMI 260</b>	Equino	Rio Grande do Sul	Brasil

### **4.3 Avaliação da susceptibilidade de *P. insidiosum* aos antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo**

A susceptibilidade dos isolados de *P. insidiosum* aos agentes antimicrobianos foi avaliada a partir de técnica de microdiluição, baseada no protocolo M38-A2, determinada pelo CLSI (2008), adaptado por Pereira et al. (2007).

#### **4.3.1 Agentes antimicrobianos**

Os antimicrobianos utilizados neste estudo foram: paromomicina, gentamicina, neomicina e estreptomicina, obtidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), e tigeciclina (Tygacil®, Pfizer).

##### **4.3.1.1 Diluição dos antimicrobianos**

As soluções estoque dos fármacos foram preparadas através da dissolução dos agentes antimicrobianos em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir das soluções estoque, foram realizadas diluições com caldo RPMI 1640 (suplementado com dextrose) em recipientes com capacidade para 10 ml, obtendo-se as concentrações desejadas de cada fármaco. As concentrações de fármaco foram adicionadas nos poços de placas de microcultivo a partir de diluições seriadas, adicionando o volume de inóculo aos poços, obtendo-se as concentrações de estudo. A concentração final nos poços foi de 128 a 0,25 mg/L para paromomicina, gentamicina, neomicina e estreptomicina e de 64 a 0,125 mg/L para tigeciclina.

#### 4.3.2 Preparação dos inóculos

A preparação dos inóculos para os testes de susceptibilidade foi realizada conforme técnica de zoosporogênese *in vitro*, descrita por Mendoza & Prendas (1988) e Pereira et al. (2007). As amostras de *P. insidiosum* previamente cultivadas em *corn meal agar* (CMA) foram repicadas para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultivo, com adição de fragmentos de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos. As placas foram incubadas por cinco dias a 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 para indução de zoosporogênese (meio de indução), composto pela solução A: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0 M), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 M), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3,66 M), e pela solução B: MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O (0,5 M), CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O (0,5 M). O meio de indução foi obtido pela mistura de 0,5 ml da solução A e 0,1 ml da solução B em 1.000 ml de água destilada estéril. As placas de Petri contendo o meio de indução, juntamente com a grama infectada foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Durante esse período, os fragmentos de grama foram regularmente observados, através de microscopia óptica (100 e 400 X) entre lâmina e lamínula. Após observação da formação de zoosporângios e liberação dos zoósporos, foi realizada a contagem de zoósporos livres no meio de indução, utilizando-se hemocitômetro de Neubauer (SANTURIO et al., 2003).

Após contagem em hemocitometria, os zoósporos foram diluídos em meio de cultura RPMI 1640 contendo L-glutamina ajustado para pH 7.0 com 0.165 M ácido morfolinopropanosulfônico, a uma concentração final de 2-10<sup>3</sup> a 3-10<sup>3</sup> zoósporos/ml (ARGENTA et al., 2008).

#### 4.3.3 Inoculação nas placas de microdiluição

Os testes foram realizados em microplacas de 96 cavidades, através de testes de concentrações dos antimicrobianos em diluições decrescentes. Os testes foram feitos em

triplicata, sendo colocadas alíquotas de 0,1 ml 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. Para cada amostra testada, foram realizados controles positivos (0,2 ml de inóculo) e negativos (0,2 ml de RPMI). A exemplificação do teste de microdiluição realizado em triplicata na microplaca pode ser visualizada na Figura 6.

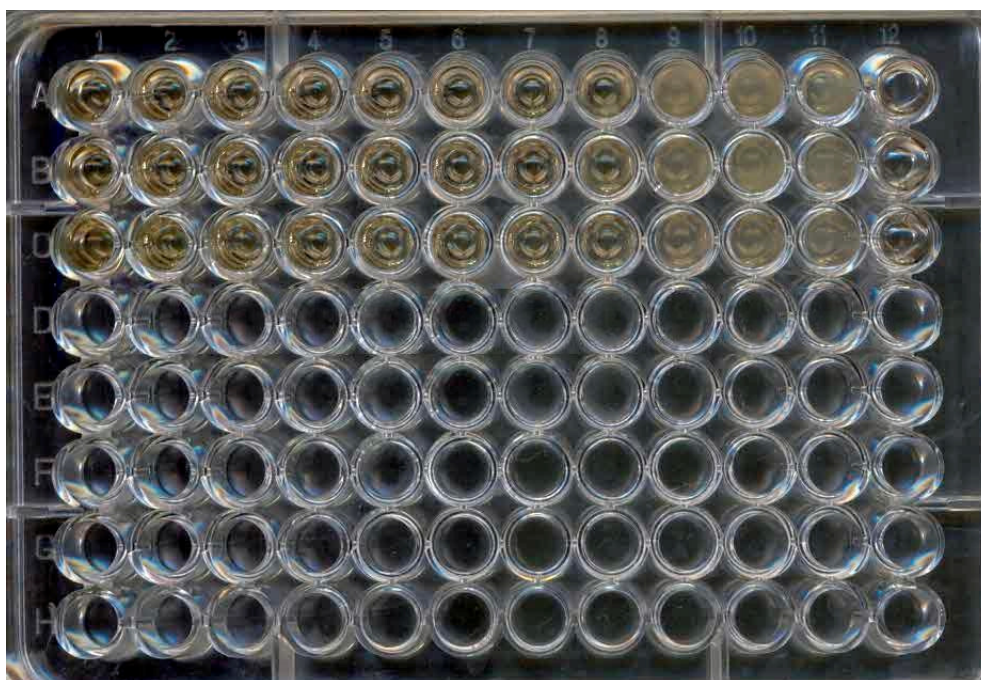


Figura 1 - Avaliação da susceptibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente à tigeciclina. Os ensaios foram realizados em triplicata (linhas A, B e C), com o controle positivo na coluna 11 e controle negativo na coluna 12.

#### 4.3.4 Incubação e leitura dos testes

As placas foram incubadas por 24 h a 37°C, sendo então o crescimento das hifas dos controles observado e realizada a leitura da concentração inibitória mínima (CIM) de cada fármaco. As CIMs foram determinadas considerando a menor concentração onde não houve crescimento miceliano quando comparado ao crescimento do controle livre de fármaco. De posse das CIMs de cada fármaco, determinou-se ainda a CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> de cada fármaco



(concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50 e 90% dos isolados, respectivamente).

Após a determinação das CIMs, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml de cada poço sem crescimento e adicionadas a tubos contendo 0,9 ml de caldo Sabouraud. Os tubos foram avaliados por 4 dias consecutivos para determinação da concentração fungicida mínima (CFM).

## **MANUSCRITO**

***In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline.**

**Manuscrito submetido a revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy***

***In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline**

**Running title:** Susceptibility of *Pythium insidiosum* to aminoglycosides and tigecycline

Deise L. Mahl <sup>a</sup>, Francielli P. K. Jesus <sup>b</sup>, Érico S. Loreto <sup>a</sup>, Régis A Zanette <sup>a</sup>,  
Maiara B. Pilotto <sup>a</sup>, Sydney H. Alves <sup>a</sup>, Janio M. Santurio <sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding author:

Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Postal Code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.:  
+55 55 32208906; fax: +55 55 32208906.

E-mail address: janio.santurio@gmail.com (J.M. Santurio).

*In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline

Abstract

This study evaluated the *in vitro* activity of aminoglycoside antibiotics and tigecycline against *Pythium insidiosum*. The susceptibility tests were carried out using the broth microdilution method in accordance with the CLSI document M38-A2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values for gentamicin, neomycin, paromomycin and streptomycin ranged from 32 to 64 mg/L and the Minimal Fungicidal Concentration (MFC) ranged from 32 to 128 mg/L, which are incompatible with safe plasma concentrations of these drugs *in vivo*. Tigecycline showed the lowest MIC (0.25-2 mg/L) and MFC (1-8 mg/L) range values. The *in vitro* susceptibility observed to tigecycline makes this drug a good option in future tests *in vitro* and *in vivo* for the management of pythiosis.

Pythiosis is a chronic disease that affects humans, 51 mammalian animals and birds and is caused by the aquatic oomycete *Pythium insidiosum*. It occurs in tropical regions, subtropical and temperate and no reports of direct transmission among animals or between animals and humans were described. Cutaneous, vascular, ocular and systemic forms (humans) and subcutaneous and gastrointestinal forms (horses, dogs, cattle, cats and sheep) are the clinical presentations most commonly observed (3).

Pythiosis progress rapidly and can become life threatening if not treated in the early stages. The absence of ergosterol in the cell wall of this oomycete restrains the treatment of pythiosis with antifungal therapy due to the fact that most of these drugs act by inhibiting the synthesis of ergosterol. Radical surgery and immunotherapy are among the best therapeutic options but the improved cure rates are directly associated with early diagnosis of pythiosis (14).

Members of the genus *Pythium* are known to be susceptible to some antibiotics of the tetracycline, macrolide, aminoglycoside and amphenicol classes (5, 6, 8, 12). McMeekin and Mendoza (9) reported that streptomycin may have a stimulatory or inhibitory effect on *P. insidiosum* depending on culture conditions and Loreto et al. (7) described an *in vitro* inhibitory activity of minocycline against *P. insidiosum*. In this context, this study aims to evaluate the *in vitro* susceptibility of the aminoglycosides gentamicin, neomycin, paromomycin and streptomycin, and the minocycline-derived tigecycline against isolates of *P. insidiosum*.

Twenty-three clinical Brazilian isolates of *P. insidiosum* from equine pythiosis cases and the ATCC 58.637 reference strain were used. The identities of the isolates were confirmed by a PCR-based assay (4).

Gentamicin, neomycin, paromomycin and streptomycin were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Tigecycline (Tygacil®, Pfizer) was purchased commercially. The drugs were dissolved 76 in dimethylsulfoxide to obtain stock solutions (12,800 mg/L) and storage at -70°C.

At present there is no standardized susceptibility testing method for oomycetes. Since *P. insidiosum* produce hyphae and based on previous *in vitro* and *in vivo* studies (7, 11), the susceptibility test was performed according to the CLSI M38-A2 protocol for filamentous fungi (2, 11). Briefly, working solutions were prepared diluting the stock solutions in RPMI 1640 broth, pH 7.0, in the same way as recommended for antifungal agents. The zoospores of *P. insidiosum* do not produce turbidity as the conidia of filamentous fungi. Thus, the final inocula

concentrations ( $2-3 \times 10^3$  zoospores/ml – the same density needed for testing dermatophyte moulds) were obtained by zoosporogenesis induction technique as previously described (15), which allows the production of abundant mycelium after 24 h of incubation at 37°C. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by visual observation and represent inhibition of 100% of mycelium growth after 24 hours of incubation at 37°C. The Minimum Fungicidal Concentrations (MFC) were determined transferring all the volume of the wells without mycelium growth to tubes containing 1 ml Sabouraud dextrose broth and incubating for up to 96 hours at 37°C. All experiments were performed in triplicate.

The *in vitro* susceptibility of 24 *P. insidiosum* isolates against gentamicin, neomycin, paromomycin streptomycin and tigecycline are listed in Table 1. For gentamicin, neomycin, paromomycin and streptomycin the MICs ranged from 32 to 64 mg/L (geometric mean [GM] from 49.3 to 55.3 mg/L) and the MFC ranged from 32 to 128 mg/L (GM from 62.1 to 73.9). Tigecycline showed the lowest MIC (0.25-2 mg/L; GM, 0.9 mg/L) and MFC (1-8 mg/L; GM, 2.4 mg/L) ranges. The results indicated that 64 mg/L of gentamicin, neomycin, paromomycin or streptomycin was the concentration able to inhibit the 101 growth (inhibitory and fungicidal effect) of at least 62.5% of all isolates. For tigecycline the concentration of 1 mg/L was able to inhibit the growth of 70.8% of the isolates and 2 mg/L showed a fungicidal effect in 50% of isolates.

Currently, there is no “gold standard” treatment for the management of pythiosis. Therapeutic success is directly related to the rapid diagnosis followed by treatment with surgical removal of the affected area, immunotherapy and/or antimicrobial therapy. Salipante et al. (13) reported an above-the-knee-amputation in a case of advanced human pythiosis even after the patient has received extensive surgical debridement and treatment with liposomal amphotericin B, posaconazole, micafungin, terbinafine and minocycline, which reinforces the challenge in the treatment of pythiosis.

McMeekin and Mendoza (9) reported that cultures of *P. insidiosum* in Sabouraud broth supplemented with streptomycin (100 mg/L or 200 mg/L) have a variable level of inhibition or stimulation of growth. In our study, using zoospores of *P. insidiosum* as inoculum, we observed the need for concentrations between 32 and 128 mg/L of the aminoglycoside antibiotics tested as necessary for the growth inhibition of *P. insidiosum*. Taken together, these results demonstrate that *P. insidiosum*, depending on *in vitro* culture conditions and drug concentration can be

inhibited by aminoglycoside antibiotics. However, serum levels of these compounds are a bottleneck for the clinical treatment of pythiosis. The therapeutic serum levels of this class of antibiotics are generally below 30 mg/L and the accumulation of higher doses can induce toxicity (1).

Tigecycline has an extensive distribution into the tissues, a half-life ranging from 37 to 67 hours and a peak serum concentration after a 1-h infusion ranging from 0.109 mg/L after a single dose of 12.5 mg to a 2.817 mg/L after a dose of 300 mg (10). Such pharmacological properties, together with the results of our study, where concentrations  $\leq 2$  mg/L inhibited *P. insidiosum* isolates *in vitro*, suggest that tigecycline is a drug that should be considered for further *P. insidiosum in vitro* and *in vivo* assays alone and in combination with other drugs.

In conclusion, *P. insidiosum* demonstrated a dose-dependent *in vitro* inhibition by aminoglycoside antibiotics and tigecycline. Comparing the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles described for aminoglycosides and tigecycline (1, 10), and the data obtained in this study, MICs of aminoglycosides against *P. insidiosum* are incompatible with safe plasma concentrations of these drugs *in vivo* but compatible with the effective plasma concentrations achieved by tigecycline. The evaluation of the susceptibility profile of tigecycline against *P. insidiosum* based on drug combination, *in vivo* experimental pythiosis and with geographically and genetically diverse *P. insidiosum* strains could elucidate the potential of this drug in the treatment of pythiosis.

### **Fundings**

Financial support was provided by CNPq and Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) of the Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

### **Conflict of interest**

None to declare.

### **Acknowledgements**

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq) for a Master's Scholarship awarded to Deise Luiza Mahl.

## References

1. **Ali, M. Z., and M. B. Goetz.** 1997. A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of single daily dosing versus multiple daily dosing of aminoglycosides. *Clin Infect Dis* **24**:796-809.
2. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard, 2nd ed. M38-A2. CLSI, Wayne, PA.
3. **Gaastra, W., L. J. A. Lipman, A. W. A. M. De Cock, T. K. Exel, R. B. G. Pegge, J. Scheurwater, R. Vilela, and L. Mendoza.** 2010. *Pythium insidiosum*: An overview. *Vet Microbiol* **146**:1-16.
4. **Grooters, A. M., and M. K. Gee.** 2002. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J Vet Intern Med* **16**:147-152.
5. **Leary, J. V., G. A. Zentmyer, L. J. Klure, E. C. Pond, and G. L. Grantham.** 1982. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* isolates in response to antibiotics. *Phytopathology* **72**:750-754.
6. **Lee, H. B., Y. Kim, J. C. Kim, G. J. Choi, S. H. Park, C. J. Kim, and H. S. Jung.** 2005. Activity of some aminoglycoside antibiotics against true fungi, *Phytophthora* and *Pythium* species. *J Appl Microbiol* **99**:836-843.
7. **Loreto, E. S., D. A. N. Mario, L. B. Denardi, S. H. Alves, and J. M. Santurio.** 2011. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:3588-3590.
8. **Marchant, R., and D. G. Smith.** 1968. Effect of chloramphenicol on growth and mitochondrial structure of *Pythium ultimum*. *J Gen Microbiol* **50**:391-397.
9. **McMeekin, D., and L. Mendoza.** 2000. *In vitro* effect of streptomycin on clinical isolates of *Pythium insidiosum*. *Mycologia* **92**:371-373.
10. **Muralidharan, G., M. Micalizzi, J. Speth, D. Raible, and S. Troy.** 2005. Pharmacokinetics of tigecycline after single and multiple doses in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:220-229.
11. **Pereira, D. I. B., J. M. Santurio, S. H. Alves, J. S. Argenta, L. Potter, A. Spanamberg, and L. Ferreira.** 2007. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against



- Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother* **60**:1168-1171.
12. **Rawn, C. D., and J. L. Vanetten.** 1978. Mechanism of antibacterial antibiotic sensitivity in *Pythium ultimum*. *J Gen Microbiol* **108**:133-139.
  13. **Salipante, S. J., D. R. Hoogestraat, D. J. Sengupta, D. Murphey, K. Panayides, E. Hamilton, I. Castaneda-Sanchez, J. Kennedy, P. W. Monsaas, L. Mendoza, K. Stephens, J. J. Dunn, and B. T. Cookson.** 2011. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection using PCR screening and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*:doi: 10.1128/JCM.06126-06111.
  14. **Santurio, J. M., S. H. Alves, D. B. Pereira, and J. S. Argenta.** 2006. Pythiosis: an emergent mycosis. *Acta Sci Vet* **34**:1-14.
  15. **Santurio, J. M., A. T. Leal, A. B. M. Leal, R. Festugatto, I. Lubeck, E. S. V. Sallis, M. V. Copetti, S. A. Alves, and L. Ferreiro.** 2003. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiososi developed and evaluated. *Vaccine* **21**:2535-2540.

Table 1. MIC and MFC values for the aminoglycosides and tigecycline against 24 *Pythium insidiosum* isolates.

Reading criteria	No. of isolates (%) with the indicated MIC (mg/L)										MIC range (mg/L)	GM
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128		
MICp	0	0	0	0	0	0	0	9 (7,5)	15 (62,5)	0	32-64	49,3
MFCp	0	0	0	0	0	0	0	2 (8,3)	15 (62,5)	7 (29,2)	32-128	73,9
MICg	0	0	0	0	0	0	0	5 (20,8)	19 (79,2)	0	32-64	55,3
MFCg	0	0	0	0	0	0	0	2 (8,3)	17 (70,8)	4 (16,7)	32-128	69,7
MICn	0	0	0	0	0	0	0	5 (20,8)	19 (79,2)	0	32-64	55,3
MFCn	0	0	0	0	0	0	0	2 (8,3)	15 (62,5)	7 (29,2)	32-128	73,9
MICs	0	0	0	0	0	0	0	8 (33,3)	16 (66,7)	0	32-64	50,7
MFCs	0	0	0	0	0	0	0	3 (12,5)	17 (70,8)	3 (12,5)	32-128	62,1
MICt	2 (8,3)	2 (8,3)	17 (70,8)	3 (12,5)	0	0	0	0	0	0	0,25-2	0,9
MFCt	0	0	10 (41,7)	2 (8,3)	7 (29,2)	5 (20,8)	0	0	0	0	1-8	2,4

MIC, minimum inhibitory concentration; MFC, minimum fungicidal concentration; p, paromomycin; g, gentamicin; n, neomycin; s, streptomycin; t, tigecycline; GM, geometric mean.

Tabelas suplementares (não publicadas)

Tabela 2. Valores de CIM e CFM de paromomicina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.

Isolado	CIM frente à paromomicina (mg/L)	CFM frente à paromomicina (mg/L)
ATCC 58637	64	
CBS 101555	64	128
LAPEMI 120	64	128
LAPEMI 121	64	64
LAPEMI 123	64	64
LAPEMI 126	32	128
LAPEMI 135	64	128
LAPEMI 137	32	64
LAPEMI 138	64	128
LAPEMI 142	32	128
LAPEMI 143	32	32
LAPEMI 156	64	64
LAPEMI 178	64	64
LAPEMI 187	32	64
LAPEMI 198	64	64
LAPEMI 210	32	64
LAPEMI 219	32	128
LAPEMI 223	32	64
LAPEMI 227	64	64
LAPEMI 232	32	32
LAPEMI 247	64	64
LAPEMI 253	64	64
LAPEMI 254	64	64
LAPEMI 260	64	64

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima.

Tabela 3. Valores de CIM e CFM de gentamicina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.

Isolado	CIM frente à gentamicina (mg/L)	CFM frente à gentamicina (mg/L)
ATCC 58637	64	64
CBS 101555	32	32
LAPEMI 120	64	128
LAPEMI 121	64	64
LAPEMI 123	32	64
LAPEMI 126	64	128
LAPEMI 135	64	128
LAPEMI 137	64	64
LAPEMI 138	64	64
LAPEMI 142	64	128
LAPEMI 143	32	64
LAPEMI 156	64	64
LAPEMI 178	64	64
LAPEMI 187	64	64
LAPEMI 198	64	64
LAPEMI 210	64	32
LAPEMI 219	32	128
LAPEMI 223	64	64
LAPEMI 227	32	64
LAPEMI 232	64	64
LAPEMI 247	64	64
LAPEMI 253	64	64
LAPEMI 254	64	64
LAPEMI 260	64	64

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima.

Tabela 4. Valores de CIM e CFM de neomicina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.

Isolado	CIM frente à neomicina (mg/L)	CFM frente à neomicina (mg/L)
ATCC 58637	64	64
CBS 101555	64	64
LAPEMI 120	64	128
LAPEMI 121	64	128
LAPEMI 123	32	32
LAPEMI 126	32	64
LAPEMI 135	64	128
LAPEMI 137	32	32
LAPEMI 138	64	128
LAPEMI 142	32	64
LAPEMI 143	32	64
LAPEMI 156	64	64
LAPEMI 178	64	64
LAPEMI 187	64	128
LAPEMI 198	64	64
LAPEMI 210	64	64
LAPEMI 219	64	64
LAPEMI 223	64	64
LAPEMI 227	64	128
LAPEMI 232	64	128
LAPEMI 247	64	64
LAPEMI 253	64	64
LAPEMI 254	64	64
LAPEMI 260	64	64

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima.

Tabela 5. Valores de CIM e CFM de estreptomicina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.

Isolado	CIM frente à estreptomicina (mg/L)	CFM frente à estreptomocina (mg/L)
ATCC 58637	32	64
CBS 101555	64	64
LAPEMI 120	64	128
LAPEMI 121	64	64
LAPEMI 123	32	32
LAPEMI 126	32	64
LAPEMI 135	64	64
LAPEMI 137	32	32
LAPEMI 138	64	64
LAPEMI 142	32	64
LAPEMI 143	32	32
LAPEMI 156	64	64
LAPEMI 178	64	64
LAPEMI 187	64	64
LAPEMI 198	64	64
LAPEMI 210	64	64
LAPEMI 219	32	128
LAPEMI 223	64	64
LAPEMI 227	64	128
LAPEMI 232	64	64
LAPEMI 247	64	32
LAPEMI 253	64	64
LAPEMI 254	64	64
LAPEMI 260	64	64

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima.

Tabela 6. Valores de CIM e CFM de tigeciclina frente aos isolados de *Pythium insidiosum*.

Isolado	CIM frente à tigeciclina (mg/L)	CFM frente à tigeciclina (mg/L)
ATCC 58637	0,5	2
CBS 101555	1	2
LAPEMI 120	1	8
LAPEMI 121	1	4
LAPEMI 123	2	4
LAPEMI 126	2	1
LAPEMI 135	1	8
LAPEMI 137	0,5	1
LAPEMI 138	1	8
LAPEMI 142	2	8
LAPEMI 143	0,25	1
LAPEMI 156	1	1
LAPEMI 178	1	4
LAPEMI 187	1	4
LAPEMI 198	1	1
LAPEMI 210	1	4
LAPEMI 219	0,25	8
LAPEMI 223	1	1
LAPEMI 227	1	4
LAPEMI 232	1	1
LAPEMI 247	1	4
LAPEMI 253	1	1
LAPEMI 254	1	1
LAPEMI 260	1	1

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima.

## 5 DISCUSSÃO

Os oomicetos diferem dos fungos devido sua parede celular composta de celulose e  $\beta$ -glucana (HENDRIX, 1964), e além disso pela ausência do ergosterol na parede celular (GROOTERS, 2003). Estes fatores dificultam o tratamento da pitiose através de terapias antifúngicas, devido ao fato da maioria destes fármacos atuarem inibindo a síntese de ergosterol (SANTURIO et al., 2006; GROOTERS, 2003).

Atualmente, não existe um protocolo padrão de tratamento para pitiose. O sucesso terapêutico está diretamente relacionado ao diagnóstico rápido, seguido de tratamento com remoção cirúrgica da área afetada, imunoterapia e/ou terapia antimicrobiana. Salipante et al. (2011) relataram amputação acima do joelho em um caso de pitiose humana avançada que foi realizada depois que o paciente já havia sido submetido a debridamento cirúrgico extenso e tinha recebido o tratamento com anfotericina B lipossomal, posaconazol, micafungina, terbinafina e minociclina. Este caso demonstra os desafios enfrentados no tratamento de pitiose.

Os procedimentos desenvolvidos por Sekhon et al. (1992) e Shenep et al. (1998), envolvendo testes para estudo de susceptibilidade *in vitro* com este oomiceto, não descrevem o preparo do inóculo e nem os mecanismos utilizados na técnica ou leitura dos resultados. Os estudos mais recentes se baseiam no documento M38-A2 para os testes de susceptibilidade. Este documento foi padronizado para fungos filamentosos, e como *P. insidiosum* se trata de um oomiceto, a técnica foi adaptada para a padronização do inóculo.

O ajuste do inóculo para testes com este micro-organismos por espectrofotometria não é indicado, devido a não produção de turbidez dos zoósporos, sendo o melhor método de obtenção do inóculo a contagem de zoósporos (PEREIRA et al., 2007). Apesar dos zoósporos não serem a forma patológica da pitiose, possuem a mesma composição de membrana plasmática e organelas que as hifas (MOORE-LANDECKER, 1996). A desvantagem da utilização de zoósporos ao invés de hifas como inóculo é a dificuldade de obtê-los em quantidade suficiente para os estudos (PEREIRA et al., 2008).

A técnica de microdiluição em caldo está bem definida para bactérias quanto a CIMs frente antimicrobianos e a resposta ao tratamento, enquanto que os pontos de corte para fungos



são definidos somente para algumas espécies e frente antifúngicos (GIL-LAMAIGNERE & MILLER, 2004).

Os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* podem ser influenciados pelo tipo de meio de cultura utilizado. O caldo RPMI tem demonstrado bons resultados nos estudos de susceptibilidade de fungos filamentosos e leveduras (GIL-LAMAIGNERE et al., 2005). Nos testes com *P. insidiosum* este tem sido o meio de cultura mais utilizado, apresentando bons resultados, com crescimento visível e homogêneo das hifas, proporcionando facilidade na leitura das CIMs (PEREIRA et al., 2007, ARGENTA et al. 2008, CAVALHEIRO et al., 2009). Nestes estudos foi verificada a atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *P. insidiosum* do antifúngico terbinafina (ARGENTA et al. 2008) e a presença de sinergismo quando associada a anfotericina B (CAVALHEIRO et al., 2009), voriconazol ou itraconazol (ARGENTA et al. 2008).

Alguns estudos demonstram que componentes do gênero *Pythium* diferem dos fungos quanto à sensibilidade a alguns antimicrobianos atuantes na intervenção da síntese protéica, sendo que alguns desses fármacos podem manifestar variados mecanismos de ação frente a estes agentes (LEARY et al., 1982; MARCHANT & SMITH, 1968; RAWN & VAN ETTEN, 1978; TSAO, 1970).

Fármacos das classes das tetraciclinas e macrolídeos demonstram atividade antimicrobiana frente a organismos eucariotos, como algas (LASS-FLORL & MAYR, 2007), fungos (LEW et al., 1977; NGUYEN et al, 1997; SHI et al., 2010), e protozoários (DEROUIN et al., 1992; LIN et al., 2002). Estes antimicrobianos não possuem o seu mecanismo de ação totalmente compreendido frente a eucariotos, sendo que os mecanismos descritos envolvem inibição da síntese protéica (RAWN & VAN ETTEN, 1978; NGUYEN et al., 1997), inibição seletiva da atividade mitocondrial e plasmideal (LIN et al., 2002) e liberação de cálcio intracelular (SHI et al., 2010). A maioria dos relatos de sensibilidade de oomicetos fitopatogênicos da família Pythiaceae a antimicrobianos tem sido relatada apenas pela inibição do crescimento (TSAO, 1970). Diferentes estudos envolvendo micro-organismos do gênero *Pythium* verificaram ação inibitória de tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol quando incorporados a meios de cultura (RAWN & VAN ETTEN, 1978). Também se evidenciou inibição da incorporação de aminoácidos em um isolado de *Pythium ultimum* frente à tetraciclina e ao cloranfenicol (RAWN & VAN ETTEN, 1977).

Estudos envolvendo patógenos de plantas dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium* demonstraram sensibilidade a aminoglicosídeos, sendo a paromomicina o que apresentou melhores resultados *in vitro* e *in vivo* (LEE et al., 2005). Frente à estreptomicina foi verificado *P. insidiosum* pode sofrer efeitos inibitórios, nulos ou estimulantes (MCMEEKIN & MENDOZA, 2000).

Os aminoglicosídeos são caracterizados pela presença de dois ou mais açúcares aminados, ligados a um anel aminociclitol por meio de ligações glicosídicas. Estes fármacos ligam-se a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, tornando as bactérias incapazes de sintetizar proteínas essenciais para seu crescimento. Estes fármacos, em geral mostram-se inativos ou pouco ativos frente aos ribossomos eucarióticos. No entanto, alguns antimicrobianos como a higromicina B são ativos contra ambas as células: procariontes e eucariotes (GONZALEZ et al. 1978; RECHT et al., 1999; LYNCH & PUGLISI, 2001). Seu modo de ação contra eucariotes não é bem definido, sendo que alguns organismos, como protozoários ciliados e parasitas intestinais, são sensíveis aos aminoglicosídeos com um grupo de 6' hidroxila, sendo o que ocorre com a paromomicina (PALMER & WILHELMW, 1978). Parece possível que os oomicetos representem um grupo bastante especial na filogenia que tem sensibilidade procariótica à ação de aminoglicosídeos, com distintos graus de sensibilidade entre as diferentes espécies ou gêneros de oomicetos (LEE et al., 2005).

Os resultados demonstraram que as CIMs e CFMs de paromomicina para 62,5% dos isolados foi de 64 mg/L. As CIMs e CFMs de gentamicina para 79,17% e 70,83% dos isolados respectivamente foi de 64 mg/L, enquanto que as CIMs e CFMs de neomicina para 74,17% e 62,5% dos isolados respectivamente foi de 64 mg/L. As CIMs e CFMs de estreptomicina para 66,67% e 70,83% dos isolados respectivamente foi de 64 mg/L. Os valores variaram de 32 a 64 mg/L para as CIMs e de 32 a 128 mg/L para as CFMs dos aminoglicosídeos. As CIMs e CFMs de tigeiciclina para 70,83% e 41,67% dos isolados respectivamente foi de 1 mg/L, com CIMs variando de 0,25 a 2 mg/L e CFMs de 1 a 8 mg/L.

As altas CIMs e CFMs verificadas neste estudo frente à paromomicina, gentamicina, neomicina e estreptomicina sugerem que *P. insidiosum* é pouco sensível a estes fármacos aminoglicosídeos, enquanto que a glicilciclina tigeiciclina foi o fármaco que apresentou melhores resultados, sendo verificada uma resposta inibitória satisfatória. Os padrões para as CIMs de tigeiciclina frente aos oomicetos ainda não estão estabelecidos, mas os *breakpoints* propostos pela

Wyeth Pharmaceuticals são: susceptível  $\leq 2$  mg/L; intermediário, entre 2 e 8 mg/L; e resistente,  $\geq 8$  mg/L, para *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Acinetobacter baumannii* (PANKEY, 2005).

A tigeciclina foi a primeira glicilciclina a estar disponível para o uso clínico, apresentando-se como um fármaco com largo espectro de ação que atua por ligação a fração 30S do ribossomo (GUAY, 2004). Suas propriedades farmacológicas são similares às da tetraciclina, mas ela não é afetada pela resistência à tetraciclina (PETERSEN et al., 1999), isto se deve a substituição de um grupo N-alkil-glicilamido no anel D na nona posição (PANKEY, 2005). Não existe um ponto de corte de susceptibilidade estabelecida pelo CLSI frente a tigeciclina (PETERSON, 2008) e existem discrepâncias entre as CIMs encontradas pelas técnicas de microdiluição e pelo E-test.

Loreto et al. (2011) descreveu atividade inibitória *in vitro* de minociclina, precursora da tigeciclina, frente a *P. insidiosum*. As CIMs encontradas foram de 0,125 a 2 mg/L, sendo que estes resultados são semelhantes aos encontrados neste estudo para tigeciclina, onde as CIMs variaram de 0,25 a 2 mg/L. O mecanismo das tetraciclina e macrolídeos frente a *P. insidiosum* deve ser semelhante ao descrito para *P. ultimum*, com redução da incorporação de aminoácidos em proteínas, inibição da síntese de proteínas e inibição do transporte de aminoácidos (RAWN & VAN ETTEN, 1978).

Tigeciclina tem uma ampla distribuição nos tecidos, uma meia-vida variando de 37 a 67 horas e um pico de concentração sérica após 1 h variando de 0,109 mg/L, após um dose única de 12,5 mg, a 2,817 mg/L após uma dose de 300 mg (MURALIDHARAN et al., 2005). Tais propriedades farmacológicas, juntamente com os resultados do nosso estudo, que mostrou que as concentrações  $\leq 2$  mg/L inibiram o crescimento de isolados de *P. insidiosum in vitro*, sugerem que a tigeciclina é uma droga que deve ser considerada para outros testes *in vitro* e *in vivo* para o controle de *P. insidiosum*, tanto sozinho quanto em combinação com outras drogas.

## 6 CONCLUSÕES

- 1- As CIMs de tigeciclina indicam sensibilidade de *P. insidiosum* e sugerem que este antibacteriano possa ter atividade terapêutica na pitiose, pois as CIMs  $\leq 2$  mg / L são inferiores às concentrações plasmáticas máximas deste agente.
- 2- Com base nos *breakpoints* estabelecidos para agentes bacterianos, as CIMs de paromomicina, gentamicina, neomicina e estreptomicina (32 a 64 mg/L) sugerem que *P. insidiosum* não é sensível a estes fármacos.

## 7 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.

ALI, M.Z.; GOETZ, M.B. A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of single daily dosing versus multiple daily dosing of aminoglycosides. **Clinical Infectious Disease**, v.24, p.796-809, 1997.

ARGENTA, J.S.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; PEREIRA, D.I.B.; CAVALHEIRO, A.S.; SPANAMBERG, A.; FERREIRO, L. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.767-769, 2008.

ASCHBACHER, P.W.; FEIL, V.J. Neomycin metabolism in calves. **Journal of Animal Science**, v.22, p.683-689, 1994.

BABINCHAK, T. et al. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of complicated intra-abdominal infections: analysis of pooled clinical trial data. **Clinical Infectious Disease**, v.41, p.354-367, 2005.

BAYLIS, C.; RENNKE, H.R.; BRENNER, B.M. Mechanism of defect in glomerular ultrafiltration associated with gentamicin administration. **Kidney International**, v.12, p.344-53, 1977.

BEAKES, G.W.; GAY, J.L. Effects of streptomycin on the growth and sporulation of *Saprolegnia* spp. **Journal of General Microbiology**, v. 119, p.361-371, 1980.

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

BEN-AMI, R. et al. Antifungal activity of colistin against *Mucorales* species in vitro and in a murine model of *Rhizopus oryzae* pulmonary infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.484-490, 2010.

BERMAN, J.D. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.11, p.707-710, 1998.

BISSONNETTE, K.W. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of medical and veterinary mycology**, v.29, p.39-44, 1991.

BOTTON, S.A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in Cutaneous Lesions of Brazilian Horses and Rabbits. **Current Microbiology**, v.62, p. 1225-1229, 2011.

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

CARNES, D. W.; LEARY, J.V. The sensitivity of *Phytophthora palmivora* to chloramphenicol. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, v. 4, p. 94-95, 1977.

CAVALHEIRO, A. S. et al. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.2136–2138, 2009a.

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

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

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

CLANCY, C.J. et al. Inhibition of RNA Synthesis as a Therapeutic Strategy against *Aspergillus* and *Fusarium*: Demonstration of *in vitro* synergy between Rifabutin and Amphotericin B **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.509-513, 1998.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. 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.

COFFEY, G.L. et al. Biological studies of paromomycin. **Antibiotics & Chemotherapy**, v.9, p.730–738, 1959.

DEROUIN, F. et al. Synergistic activity of clarithromycin and minocycline in an animal model of acute experimental toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, p.2852–2855, 1992.

DE VRIES, H.; AGSTERIBBEE; KROONA, M. The ‘fragment reaction’: a tool for the discrimination between cytoplasmic and mitochondrial ribosomes. **Biochimica et biophysica acta**, v.246, p.111-122, 1971.

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

DOS SANTOS, O.F. et al. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. **Kidney International**, v.40, p.742-747, 1991.

DYKSTRA, C. C. et al. Selective inhibition of topoisomerases from *Pneumocystis carinii* compared with that of topoisomerases from mammalian cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.38, p.1890–1898, 1994.

EDSON, R.S.; TERRELL, C.L. The Aminoglycosides. **Mayo Clinic Proceedings**, v.74, p.519-528, 1999.

EDWARDS, J. E. et al. Combined effect of amphotericin B and rifampin on *Candida* species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.17, p.484-487, 1980.

ELIOTT, C. G. Sterols in fungi: Their functions in growth and reproduction. **Advanced Microbiology Physiology**, v.15, p. 121-173, 1977.

ELLIS-GROSSE, E.J. et al. The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam. **Clinical Infectious Disease**, v.41, p.341-353, 2005.

ELSEA, S. H.; OSHEROFF, N.; NITISS, J.L.N. Cytotoxicity of quinolones toward eukaryotic cells. Identification of topoisomerase II as the primary cellular target for the quinolone CP-115,953 in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.13150-13153, 1982.

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

FOIL, C.S.O. et al. A report of subcutaneous pythiosis in 5 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. Update on pythiosis (Oomycosis). **Proceedings**, p. 57-63, 1996.

FOSTEL, J.; MONTGOMERY, D.; LARTEY, P. Comparison of responses of DNA topoisomerase I from *Candida albicans* and human cells to four new agents which stimulate topoisomerase-dependent DNA nicking. **FEMS Microbiology Letter**, v. 138, p.105–111, 1996.

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

GELLERT, M. et al. -I. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. **Proceedings of National Academic Science**, v.74, p.4772–4776, 1977.

GILBERT, D.N. Aminoglycosides. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. **Principles and practice of infectious diseases**. 4th ed. New York:Churchill Livingstone, 1995; p.279-306.

GIL-LAMAIGNERE, C.; MULLER, F.M. Differential effects of the combination of caspofungin and terbinafine against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida kefyr*. **Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.520-523, 2004.

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



GIRIO, T.M.S. et al. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospirúria em touros (*bos taurus indictus*) naturalmente infectados pelo sorovar hardjo. **Arquivos do instituto biológico**, v.72, n.2, p.161-170, 2005.

GLASHAN, R. de Q. O que o enfermeiro deveria saber antes de administrar aminoglicosídeos ao cliente/paciente. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.9, p. 45-52. 1996.

GONZALEZ, A. et al. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.521, p.459–469, 1978.

GONZÁLES, H.E. et al. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. **Rev ICA**, v.14, p.115-121, 1979.

GRIVELL, A. Amino acid incorporation by mitochondria isolated, essentially free of microorganisms, from *Saccharomyces carlsbergensis*. **Biochemical Journal**, v.105, p. 44-46, 1967.

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

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

GUAY, D.R. Oritavancin and tigecycline: investigational antimicrobials for multidrug-resistant bacteria. **Pharmacotherapy**, v.24, p. 58–68, 2004.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.;GOLDAM. **As bases farmacológicas da terapêutica: fármacos antimicrobianos**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill., 1996. p.812-848.

HELMAN, R.G.; OLIVER, J. Pythiosis of the digestive tract in dogs from Oklahoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, p.111-114, 1999.

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

HENDRIX, J. W. Physiology and biochemistry of growth and reproduction in *Pythium*. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, v. 22, p.743-752, 1974.

HOBAN, D.J. et al. Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program) Group. *In vitro* activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST program, 2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.52, p.215-27, 2005.

HOWERTH, E.W.; BROWN, C.C.; CROWDER, C. Subcutaneous pythiosis in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p.81-83, 1989.

HUGHES, C. E. et al. *In vitro* activities of amphotericin B in combination with four antifungal agents and rifampin against *Aspergillus spp.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.25, p.560-562, 1984.

HUPPERT, M.; SUN, S.H.; VUKOVICH, K.R. Combined amphotericin B-tetracycline therapy for experimental coccidioidomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.5, p.473-478, 1974.

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

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

KASBEKAR, N.; Tigecycline: A new glycylycylcline antimicrobial agent. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.63, p.1235-1243, 2006.

KOBAYASHI, G.S. et al. Amphotericin B potentiation of rifampin as an antifungal agent against the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. **Science**, v.177, p.709-710, 1972.

KRAJAEJUN, T.B. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical and Infectious Disease**, v. 43, p.569–576, 2006.

LAMB, A. J.; CLARK-WALKEGR., D.; LINNANE, A.W. The biogenesis of mitochondria 4: the differentiation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems *in vitro* by antibiotics. **Biochimica et biophysica acta**, v. 161, p. 415-427, 1968.

LAMPEN, J. O. Interference by polyenic antifungal antibiotics (especially nystatin and filipin) with specific membrane functions. **Symposium of the Society of General Microbiology**, v.16, p.111-130, 1966.

LASS-FLORL, C.; MAYR, A. Human protothecosis. **Clinical Microbiology**, v.20, p.230–242, 2007.

LEARY, J.V. et al. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* isolates in response to antibiotics. **Phytopathology**, v. 72, p.750-754, 1982.

LEAL, A.T. **Pythium insidiosum: Caracterização antigênica preliminar e avaliação de adjuvantes na indução de resposta sorológica em coelhos**. 1999. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

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.

LEW, M. A.; BECKETT, K. M.; LEVIN, M. S. Antifungal activity of four tetracycline analogues *in vitro*: potentiation by amphotericin B. **Journal of Infectious Disease**, v. 136, p.263-270, 1977.

LIN, Q. H.; KATAKURA, K.; SUZUKI, M. Inhibition of mitochondrial and plastid activity of *Plasmodium falciparum* by minocycline. **FEBS Letters**, v.515, p.71–74, 2002.

LYNCH, S.R.; PUGLISI, J.D. Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. **Journal of Molecular Biology**, v.306, p.1037–1058, 2001.

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

LOPES, H.V. Tigeciclina: nova arma antibacteriana. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.8, p.45-46, 2006.

MARCHANT, R.; SMITHD, G. The effect of chloramphenicol on growth and mitochondrial structure of *Pythium ultimum*. **Journal of General Microbiology**, v. 50, p. 391-397, 1968.

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

MCMEEKIN, D. Streptomycin inhibition of *Peronospora parasitica* and its host reversed by manganese and calcium. **Phytopathology**, v.63 p.34-36, 1973.

MCMEEKIN, D. Inhibition and Stimulation of Growth of *Pythium* by Streptomycin. **Mycologia**, v. 70, p. 880-883, 1978.

MCMEEKIN, D.; MENDOZA, L. In Vitro Effect of Streptomycin on Clinical Isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycologia**, v.92, p.371-373, 2000.

MCMEEKIN, D.; BRAYBURG, J.; KOBAYASHI, G. S. Antifungal agents in therapy of systemic fungal infections. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.23, p.303-330, 1983.

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

MEDOFF, G. M. et al. Potentiation of rifampin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B. **Proceedings of National Academic Science**, v.69, p.196-199, 1972.

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

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

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

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

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

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

MENDOZA, L. ; 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.

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, 1982.

MILLER, R.I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v.81, n.1, p.23-28, 1983

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

MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. **Veterinary Pathology**, v.21, p.325- 332, 1984.

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

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 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

MOORE-LANDECKER, J. **Fundamentals of the Fungi**. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, Inc. Cap. 3: Zoosporic fungi, p. 33-79, 1996.

MULLER, K. O.; MACKAY, J. H. E.; FRIEND, J. N. Effect of streptomycin on the host-pathogen relationship of a fungal phytopathogen. **Nature**, v.174, p.878-879, 1954.

MURALIDHARAN, G. et al. Pharmacokinetics of tigecycline after single and multiple doses in healthy subjects. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.49, p.220-229, 2005.

NEUGARTEN, J.; AYNEDJIAN, H.S.; BANK, N. The role of tubular obstruction in acute renal failure due to gentamicin. **Kidney International**, v.24, p.330-335, 1983.

NGUYEN, M. H. et al. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by azithromycin against *Aspergillus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v.16, p.846–848, 1997.

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, J.E. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v.21, p.444-452, 2006.

ORCI, L. et al. Opposite polarity of filipin-inducer deformations in the membrane of condensing vacuoles and zymogen granulates. **Science**, v.210, p.1019-1021, 1980.

PALMER, E.; WILHELMW, J.M. Mistranslation in a eukaryotic organism. **Cell**, v.13, p.329–334, 1978.

PANKEY, G.A. Tigecycline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.470–480, 2005.

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

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

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

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

PESTKA, S. Inhibitors of ribosome function. **Annual Review of Microbiology**, v.25, p.487-562, 1971.

PESTKA, S. Chloramphenicol. In Antibiotics Vol. 111. **Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents**, Edited by J. W. Corcoran & F. E. Hahn. New York: Springer Verlag, 1975. p. 370-395.

PETERSEN, P.J. et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of a novel glycylicycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.43, p.738-744, 1999.

PETERSON, L. R. A review of tigecycline the first glycylicycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, p.215-222, 2008.

PETROU, M. A.; ROGERS, T. R. *In-vitro* activity of antifungal agents in combination with four quinolones. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v.14, p.9-18, 1988.

PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALER, R.D. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 3rd Ed. Iowa State University Press, Ames, 2000. p.191-228.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.586-593.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5<sup>a</sup> ed. Elsevier, Rio de Janeiro, Brasil, 2004, p.904.

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

RAWN, C.D.; VAN ETTEN, J.L. Mechanism of Antibacterial Antibiotic Sensitivity in *Pythium ultimum*. **Journal of General Microbiology**, v.108, p.133-139, 1978.

RAWN, C.D.; SCHWARZ, M. Protection of *Pythium* species against antibacterial antibiotics by cholesterol. **Phytopathology**, v.77, p.319-323, 1987.

RECHT, M.I.; DOUTHWAITE, S.; PUGLISI, J.D. Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. **The EMBO Journal**, v.18, p.3133–3138, 1999.

RIFKIND, E.; CROWDER, E.D.; HYLAND, R.N. *In vitro* inhibition of *Coccidioides immitis* strains with amphotericin B plus rifampin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.6, p.783-784, 1974.

RODVOLD, K.A.; ZOKUFA, H.; ROTSCHAFFER, J.C. Aminoglycoside pharmacokinetic monitoring: an integral part of patient care. **Clinical pharmacology**, v.7, p.608-613, 1988.

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

ROOKE, D.M.; SHATTOCK, R.C. Effect of Chloramphenicol and Streptomycin on Developmental Stages of *Phytophthora infestans*. **Journal of General Microbiology**, v.129, p.3401-3410, 1983.

SALIPANTE, S. J. et al. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection using PCR screening and DNA sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**: doi: 10.1128/JCM.06126-06111.

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

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

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



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

SATO, K. et al. Antimicrobial activity of DU-6859, a new potent fluoroquinolone, against clinical isolates. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v.36, p.1491–1498, 1992.

SCHATZ, G.; MASON, T.L. The biosynthesis of mitochondrial proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v.43, p.51-87, 1974.

SCHOR, N. et al. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. **Kidney International**, v.19, p.88-96, 1981.

SCHWARTZ, S.N. et al. Antifungal properties of polymyxin B and its potentiation of tetracycline as an antifungal agent. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v.2, p.36-40, 1972.

SEDRISH, S.A. et al Adjunctive use of a neodymium:yttrium-aluminum garnet *laser* for treatment of pythiosis granulomas in two horses. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.211, p.464-465, 1997.

SEKHON, A.S.; PADHYE, A.A.; GARG, A.K. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffe* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. **European Journal of Epidemiology**, v.8, p.427–32, 1992.

SHAHAN, T.A.; PORE, R.S. In vitro susceptibility of *Prototheca* spp. to gentamicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.2434-2435, 1991.

SHATTOCK, R. C.; SHAW, D.S. Mutants of *Phytophthora infestans* resistant to, and dependent upon antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.64, p.29-41, 1975.

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

SHEN, L.L.; BARANOWSKI, J.; FOSTEL, J.; MONTGOMERY, D.A; LARTEY, P.A.L. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 36, p.2778–2784, 1992.

SHEN, L.L.; FOSTEL, J.M. DNA topoisomerase inhibitors as antifungal agents. **Advances in Pharmacology**, v.29, p.227–244, 1994.

SHIPTON, W.A. Regulation by Ions of Zoospore release in *Pythium*. **Australian Journal of Botany**, v.35, p.79-89, 1987.

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

SILVA, P. **Farmacologia**. 4<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 1024p.

SOUSA, J.C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. 1. Ed. Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2005.

SPADER, T.B. et al. In vitro interactions between amphotericin B and other antifungal agents and rifampin against *Fusarium* spp. **Mycoses**, v.54, p.131-136, 2011.

STEAD, D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. **Journal of Chromatography**, v.747, p.69-93, 2000.

SUGINO, A. et al. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. **Proceedings of National Academic Science**, v.74, p.4767–4771, 1977.

SUM, P.E.; SUM, F.W.; PROJAN, S.J. Recent developments in tetracycline antibiotics **Current Pharmaceutical Design**, v.4, p.119–32, 1998.

SUNDAR, S. et al. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v.356, p.2571-2581, 2007.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: the complete drug reference**. 34 ed. Londres, 2005. p. 2756.

SWIEZYNSKKI, M.; JANKOWSKHA. Drug resistant isolates of *Phytophthora infestans*. **Genetica polonica**, v.11, p.27-35, 1970.

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

TAVARES, W. Aminociclitóis aminoglicosídeos. In: Tavares W, ed. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu; 2001. p.573-626.

THITITHANYANONT, A. et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a lifethreatening human arteritic infection caused by *Pythiuminsidiosum*. **Clinical and Infectial Disease**, v.27, p.1394-1400, 1998.

TRABULSI, L.R.; SOARES, L. A. Antibióticos aminoglicosídeos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p 1006-1014.

TSAO, P. H. Selective media for isolation of pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v.8, p.157-186, 1970.

VANGDAL, M.; BERGAN, T. *In vitro* synergistic activity of norfloxacin and amphotericin-B against fungi. **Drugs under experimental and clinical research**, v.10, p.433-444, 1984.

VENTURINI, T.P. et al. In vitro synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.71, p.126-130, 2011.

WALSH, T. J. et al. Augmentation of *in vitro* antifungal activity by norfloxacin, abstr. 971, p. 262. In: Program and abstracts of the 23rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **American Society for Microbiology**, 1983.

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.

WEINSTEIN, M.J. et al. Gentamicin, a new antibiotic complex from micronsopora. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.6, p.463-464, 1963.

WEINSTEIN, M.J. et al. Biological activity of the antibiotic components of the gentamicin complex. **Journal of Bacteriology**, v.94, p.789-790, 1967.

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

WHO. Evaluation of certain veterinary drug residues in food (Forty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). **Technical Report Series**, Geneva, 1995.