

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
TESE DE DOUTORADO**

**DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA**

**Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Pythium insidiosum*: Estudo comparativo entre acetato de caspofungina e imunoterapia em coelhos**

**PORTO ALEGRE**

**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA**

**Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Pythium insidiosum*: Estudo comparativo entre acetato de caspofungina e imunoterapia em coelhos**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, junto à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Subárea: Microbiologia

Especialidade: Micologia

Orientador: **PROF. DR. LAERTE FERREIRO**

Co-orientador: **PROF. DR. JANIO MORAIS SANTURIO**

**PORTO ALEGRE**

**2008**

*Aos meus pais, que me ensinaram que com dedicação e perseverança eu poderia concretizar meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é pouco, muito pouco, porém é o que posso fazer nesse momento....

- À Deus, pelo milagre da vida e por sempre guiar meus passos;
- À minha família, pois sem ela eu simplesmente não teria chegado até aqui;
- Ao meu orientador Prof. Dr. Laerte Ferreira, pela oportunidade, amizade e confiança;
- Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Janio Morais Santurio, por ter confiado de olhos fechados na minha capacidade, por ter me recebido de braços abertos e pela sua valiosa amizade e orientação. Faltam palavras para expressar a minha gratidão ...
- Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, pela sua amizade, apoio e disposição. Sua ajuda foi imprescindível na concretização deste trabalho;
- Ao pessoal do Laboratório de Pesquisas Micológicas (“Família LAPEMI”) pela recepção, auxílio no desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela amizade;
- À colega e amigona Juliana Argenta, pela ajuda e companheirismo;
- À professora Ione Denardin e Hanna, pelo auxílio no experimento com os animais;
- À Universidade Federal de Santa Maria e ao LAPEMI, por oportunizar a realização deste trabalho;
- Às grandes amigas “irmãs” Elisa Simone Viégas Sallis, Luciana Pötter e Sônia Botton, pelo auxílio técnico, paciência e apoio nos momentos difíceis;
- Aos meus companheiros da “República Autista”, Raquel Rech, Soraia Souza e Jorje Schafhäuser. Santa Maria foi muito melhor com vocês por perto;
- Ao grande amigo, Amilton Vallandro Marçal, pelo incentivo e exemplo de dedicação;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho;
- Não poderia esquecer de agradecer aos “meus coelhinhos” que doaram suas vidas em favor da ciência.

## RESUMO

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum*, classificado no Reino *Stramenipila*, é o agente etiológico da pitiose, uma doença crônica, piogranulomatosa, que acomete eqüinos, caninos, felinos, bovinos, ovinos e humanos que habitam regiões tropicais e subtropicais. Diversos protocolos para o tratamento da enfermidade têm sido utilizados, incluindo terapia com antifúngicos, cirurgia e imunoterapia. O presente estudo objetivou avaliar a suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados clínicos de *Pythium insidiosum* ao acetato de caspofungina, bem como correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com a resposta da terapêutica *in vivo* e comparar a eficácia de dois tratamentos, acetato de caspofungina e imunoterapia, utilizando coelhos como modelo experimental. Vinte e seis isolados de *Pythium insidiosum* provenientes de casos clínicos de pitiose em animais no Brasil (24 eqüinos, 01 canino e 01 ovino) e um isolado ATCC (58637) foram avaliados neste estudo. Os testes *in vitro* foram desenvolvidos utilizando-se a macrotécnica em caldo seguindo o protocolo internacional M38-A do CLSI. O inóculo consistiu de uma suspensão de  $2-3 \times 10^3$  zoósporos de *Pythium insidiosum* diluído 1:10 em caldo RPMI. As concentrações finais do acetato de caspofungina variaram de 0,25 – 128  $\mu\text{g/mL}$ . A leitura dos CIMs foi visual, considerando-se o crescimento ou não de hifas em 24 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , sendo adotados 3 critérios de leitura: CIM0; CIM1 e CIM2 (100%, 90% e 50% de inibição de crescimento, respectivamente), assim como também foi determinada a concentração fungicida mínima. No ensaio *in vivo*, 15 coelhos inoculados subcutaneamente com 20.000 zoósporos de *Pythium insidiosum* foram divididos em 3 grupos de 5 animais (grupo 1, controle; grupo 2, tratado com imunoterápico Pitium Vac® e grupo 3, tratado com acetato de caspofungina). Os tratamentos iniciaram-se 25 dias após a inoculação e consistiram de: 1) 8 doses de imunoterápico administradas em intervalos de 14 dias; 2) 1 mg/kg/dia de acetato de caspofungina durante 20 dias consecutivos. Dezoito semanas após o início do experimento, os animais foram necropsiados e fragmentos de lesões foram coletados para análise histopatológica e morfométrica. Quatorze isolados (51,8%) evidenciaram CIM0 de 64  $\mu\text{g/mL}$  e 24 (88,8%) CIM1 com variação de  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  a 64  $\mu\text{g/mL}$ . Na determinação da concentração fungicida mínima, 17 (62,9%) amostras requereram 64  $\mu\text{g/mL}$ . Os animais de ambos os tratamentos apresentaram redução da área de lesões, quando comparados aos animais do grupo controle ( $P < 0.05$ ). As áreas de lesões dos coelhos tratados com acetato de caspofungina evidenciaram redução durante o tratamento, porém rapidamente retornaram a progredir quando a administração do fármaco foi suspensa. O aspecto histológico das lesões foi similar entre os grupos estudados e a avaliação morfométrica evidenciou que os animais dos grupos 2 e 3 apresentaram menor quantidade de hifas nas áreas de necrose ( $P < 0.05$ ). Os resultados obtidos evidenciam que, embora não tenha havido diferença entre os tratamentos avaliados, a imunoterapia, em função de seu custo, continua sendo a melhor alternativa para o tratamento da pitiose. A ocorrência de altas CIMs associada a falta de atividade fungicida do acetato de caspofungina observados neste estudo, sugerem que *Pythium insidiosum* é pouco suscetível a este antifúngico.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*, oomiceto, pitiose, acetato de caspofungina, imunoterapia, Pitium Vac, coelho.

## ABSTRACT

*Pythium insidiosum* is an oomycete classified in the Kingdom Stramenipila. It causes pythiosis, a chronic, difficult-to-treat, pyogranulomatous disease that affects mainly horses, but can also affect dogs, cats, cattle, sheep and humans that inhabit tropical and subtropical regions. Several protocols to treat pythiosis have been used, including antifungal drug administration, surgery and immunotherapy. The present study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of 27 *Pythium insidiosum* clinical isolates to caspofungin acetate, as well as to relate the results obtained *in vitro* with the response of *in vivo* therapy, and to assess the efficacy of two treatments, immunotherapy and caspofungin acetate administration, in rabbits with experimental pythiosis. Twenty-six samples of *Pythium insidiosum* isolated from pythiosis lesions from animals in Brazil (24 horses, 01 dog and 01 sheep) and one ATCC isolate (58637) were studied. The *in vitro* tests were performed using the broth macrodilution method following the CLSI M38-A protocol. The inoculum consisted of a suspension containing  $2-3 \times 10^3$  *Pythium insidiosum* zoospores diluted 1:10 with RPMI broth. The final concentrations of caspofungin acetate were 0.25 – 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The MICs were read after 24 h of incubation at 37° C. The reading was visual and assessed the growth or absence of growth of hyphae. Three MIC reading criteria were adopted: MIC0, MIC1 and MIC2 (growth inhibition of 100%, 90% and 50%, respectively). The minimum fungicidal concentration was also determined. For the *in vivo* assay, fifteen rabbits were subcutaneously inoculated with 20,000 *Pythium insidiosum* zoospores and were divided into 3 groups of 5 animals (group 1, control; group 2, treated with Pitium Vac® immunotherapeutic; and group 3, treated with caspofungin acetate). The treatments were started 25 days after the inoculation, and consisted of: 1) 8 doses of the immunotherapeutic administered at 14-day intervals; and 2) 1mg/kg/day of caspofungin acetate during 20 consecutive days. The animals were necropsied eighteen weeks after the start of the experiment, and lesion fragments were collected for histopathologic and morphometric analyses. Fourteen isolates (51.8%) had an MIC0 of 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and 24 (88.8%) had an MIC1 that varied between  $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$  and 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . When subjected to the minimum fungicidal concentration assay, 17 (62.9%) samples required 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The animals in both treatment groups displayed smaller lesion sizes compared to the animals of group control ( $P < 0.05$ ). The subcutaneous lesion areas of rabbits treated with caspofungin acetate exhibited a reduction in their progression during the treatment. However, lesions quickly resumed growth when the administration of the drug was suspended. The histological aspect of the lesions was similar between the groups under study, and the morphometric evaluation showed that the animals in groups 2 and 3 had lower amounts of hyphae in necrotic areas ( $P < 0.05$ ). The results obtained indicate that, even though the treatments did not differ significantly, the immunotherapeutic treatment is still the best alternative to treat pythiosis. In addition, the high MICs and lack of fungicidal activity of caspofungin acetate suggest that *Pythium insidiosum* is poorly susceptible to this antifungal drug.

**Keywords:** *Pythium insidiosum*, oomycete, pythiosis, caspofungin acetate, immunotherapy, Pitium Vac, rabbits.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 2

FIGURA 1- Percentage variation of the subcutaneous lesion areas in rabbits experimentally inoculated with *Pythium insidiosum* zoospores and treated with the antifungal caspofungin .....58

### ARTIGO 3

FIGURA 1- Percent variation of subcutaneous lesion areas in rabbits experimentally inoculated with *Pythium insidiosum* zoospores and treated with caspofungin or the immunotherapeutic Pitium Vac .....82

FIGURA 2- Subcutaneous tissue of a rabbit inoculated with *Pythium insidiosum* and necropsied after 18 weeks. Necrotic area with cell debris and hyphae-like structures surrounded by Splendore-Hoeppli reactive areas (arrow). HE. 10x objective.....84

FIGURA 3- Subcutaneous tissue of rabbits inoculated with *Pythium insidiosum* and necropsied after 18 weeks. The structures stained black correspond to *Pythium insidiosum* hyphae. Panels A (Control); B (Pitium Vac<sup>®</sup>) and C (Caspofungin) show the differences in the amount of hyphae between the treatments. Grocott. Magnification 10x.....86

**LISTA DE TABELAS**

## ARTIGO 2

TABELA 1- Distribution of caspofungin MICs for 27 *P. insidiosum* isolates using three reading criteria.....57

## TABELA SUPLEMENTAR

TABELA 1 Procedência de 27 isolados de *Pythium insidiosum* avaliados no estudo.....60

## ARTIGO 3

## TABELA SUPPLEMENTAR

TABELA 1 Valores médios percentuais das áreas de lesões subcutâneas dos coelhos inoculados com zoósporos de *Pythium insidiosum*.....87



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1 Histórico e Taxonomia .....	12
2.2 <i>Pythium insidiosum</i> .....	14
2.3 Pitiose .....	16
2.3.1 Epidemiologia .....	16
2.3.2 Ciclo de vida do <i>Pythium insidiosum</i> .....	18
2.3.3 Patogenia .....	19
2.3.4 Pitiose em eqüinos .....	20
2.3.5 Pitiose em caninos .....	23
2.3.6 Pitiose em felinos .....	25
2.3.7 Pitiose em bovinos .....	26
2.3.8 Pitiose em ovinos .....	26
2.3.9 Pitiose em coelhos .....	27
2.3.10 Pitiose em espécies selvagens .....	28
2.3.11 Pitiose em humanos .....	28
2.4 Diagnóstico .....	30
2.4.1 Diagnóstico microbiológico .....	30
2.4.2 Diagnóstico sorológico .....	31
2.4.3 Diagnóstico molecular .....	34
2.5 Tratamento .....	35
2.5.1 Cirurgia e Quimioterapia .....	35
2.5.2 Imunoterapia .....	37
2.6 Acetato de caspofungina .....	41
2.7 Norma M38-A: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos: Norma aprovada do NCCLS .....	45
CAPÍTULO 1 .....	47
ARTIGO 1 .....	48
CAPÍTULO 2 .....	54
ARTIGO 2 .....	55
CAPÍTULO 3 .....	61
ARTIGO 3 .....	62
3 DISCUSSÃO .....	88
4 CONCLUSÕES .....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100

## 1 INTRODUÇÃO

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum*, atualmente classificado no Reino *Stramenipila*, é o agente etiológico da pitiose, uma doença crônica, piogranulomatosa, que acomete eqüinos, caninos, felinos, bovinos, ovinos e humanos que habitam regiões tropicais e subtropicais (MENDOZA & NEWTON, 2005).

A enfermidade é observada mais freqüentemente em eqüinos, principalmente nas formas clínicas cutânea e subcutânea. Nestes animais, a doença é progressiva e caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, localizadas predominantemente, nas extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal (MILLER & CAMPBELL, 1982a; CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDOZA *et al.*, 1996). Nos caninos, a segunda espécie mais afetada pela doença, as infecções por *Pythium insidiosum* determinam o desenvolvimento de piogranulomas cutâneos e gastrointestinais (GROOTERS, 2003). Já em felinos, bovinos e ovinos, a doença é esporádica, podendo manifestar-se na forma cutânea e gastrointestinal nos felinos (BISSONNETTE *et al.*, 1991, RAKICH *et al.*, 2005) e cutânea em bovinos e ovinos (SANTURIO *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2005; TABOSA *et al.*, 2004). Em humanos, a pitiose é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, podendo apresentar-se sob três formas clínicas distintas: cutânea, ocular e sistêmica. Embora a maioria dos casos de pitiose em humanos seja observada na Tailândia (IMWIDTHAYA, 1994; KRAJAEJUN *et al.*, 2006a), relatos da enfermidade também têm sido descritos em outros países, inclusive o Brasil (PRASERTWITAYAKIJ *et al.*, 2003; BOSCO *et al.*, 2005).

Dificuldades no tratamento da pitiose são encontradas em todas as espécies afetadas. Diversos protocolos de tratamento têm sido utilizados, incluindo terapia com fármacos antifúngicos, cirurgia e imunoterapia. Alguns autores sugerem que a melhor opção de tratamento é a cirurgia, entretanto, além das altas taxas de recidiva, esta prática não pode ser realizada em regiões envolvendo áreas anatômicas delicadas como os membros, normalmente afetados na pitiose eqüina (CHAFFIN *et al.*, 1995). Desta forma, a terapia antifúngica surge como alternativa. Entretanto, o tratamento com antifúngicos tem apresentado resultados variados e algumas vezes contraditórios, quando comparados aos resultados dos testes *in vitro* (McMULLAN *et al.*, 1977; FOIL *et al.*, 1984; ENGLISH & FROST, 1984; BISSONNETTE *et al.*, 1991; TRISCOTT *et al.*, 1993; SHENEP *et al.*, 1998; DYKSTRA *et al.*, 1999, JAEGER *et al.*, 2002; GROOTERS, 2003; RIVIERRE

*et*

*al.*, 2005; PUPAIBOOL *et al.*, 2006). A carência de estudos de suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* aos fármacos antifúngicos, associada à ausência de métodos de padronização para testes *in vitro* com este oomiceto, podem explicar as discrepâncias observadas entre esses resultados. Além disso, as características peculiares do *Pythium insidiosum*, sobretudo sua composição de parede celular e ausência de ergosterol na membrana citoplasmática, justificam os resultados desanimadores com as terapias antifúngicas, uma vez que o ergosterol constitui o componente alvo de ação da maioria dos fármacos antifúngicos comumente utilizados na terapêutica clínica (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989; FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Porém, como estes microrganismos apresentam  $\beta$ -glucana na composição de sua parede celular, novos antifúngicos, assim como as equinocandinas, cujo mecanismo de ação é a inibição da síntese de  $\beta(1,3)$ -D-glucana da parede celular fúngica, prometem ser eficazes contra *Pythium insidiosum* (GROOTERS, 2003).

A falta de escolhas terapêuticas encorajou o desenvolvimento e o uso de imunoterapia no tratamento da pitiose eqüina (MENDOZA *et al.*, 2003). As pesquisas iniciaram-se com Miller, em 1981, avançando de maneira significativa a partir de 1998 (SANTURIO *et al.*, 2006a). Embora os imunoterápicos de corrente uso apresentem índices de cura em torno de 70-80% no tratamento da pitiose eqüina (MONTEIRO, 1999; MENDOZA *et al.*, 2003), em cães e gatos tem demonstrado resultados frustrantes (MENDOZA & NEWTON, 2005).

Considerando-se a importância da pitiose, o aumento do número de casos diagnosticados em animais e humanos e a problemática de sua terapêutica, propôs-se este estudo, cujos objetivos foram:

- Adaptar a técnica de macrodiluição em caldo padronizada pelo documento M-38 A do CLSI (*Committee for Clinical Laboratory Standards*) para testes de suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum*;
- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* do *Pythium insidiosum* ao antifúngico acetato de caspofungina, utilizando a metodologia padronizada pelo documento M-38 A do CLSI;
- Correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com a resposta da terapêutica *in vivo* em coelhos com pitiose experimental e submetidos ao tratamento com acetato de caspofungina;
- Comparar a eficácia de dois tratamentos, acetato de caspofungina e imunoterapia, para pitiose utilizando coelhos como modelo experimental;

- Estudar a histopatologia das lesões dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, verificando a ocorrência de diferenças histológicas entre os grupos e determinando o grau de eficácia de cada tratamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico e Taxonomia

É provável que os primeiros casos de pitiose eqüina tenham sido observados no final do século XIX. Entretanto, estes primeiros diagnósticos foram confusos devido à similaridade das lesões de pitiose com habronemíase cutânea (MENDOZA & NEWTON, 2005). Segundo De Cock *et al.* (1987), Mendoza *et al.* (1996) e Mendoza & Newton (2005), as primeiras descrições publicadas foram realizadas em 1884 por Smith e em 1896 por Drouin, ao observarem a natureza miceliana do agente etiológico. Porém, a primeira evidência definitiva de *Pythium* como organismo fúngico foi realizada em 1895 por Fish (apud MENDOZA & NEWTON, 2005) ao descrever a presença de hifas com características de hifomicetos em lesões de eqüinos acometidos com *leeches* na Flórida. No entanto, o primeiro isolamento do agente etiológico da doença foi realizado em 1901 por Haan & Hoogkamer (apud DE COCK *et al.*, 1987; MENDOZA *et al.*, 1996; MENDOZA & NEWTON, 2005), a partir de granulomas subcutâneos em eqüinos na Indonésia. Na ocasião, denominaram a enfermidade de “hyphomycoses destruens”, sem classificar o agente. Posteriormente o nome da doença foi modificado para “hyphomycoses destruens equi” (DE COCK *et al.*, 1987; MENDOZA *et al.*, 1996; MENDOZA & NEWTON, 2005). Em 1924, Witkamp (apud MENDOZA *et al.*, 1996; MENDOZA & NEWTON, 2005) relatou vários aspectos da pitiose em eqüinos e isolou o agente etiológico pela segunda vez. Trinta e sete anos após, Bridges & Emmons (1961) conseguiram realizar a identificação do microrganismo ao o isolarem de lesões subcutâneas de oito eqüinos e o denominaram de *Hyphomyces destruens*. Os autores consideraram que o microrganismo isolado era um ficomiceto, possivelmente do gênero *Mortierella*, baseados na sua morfologia e micélio não esporulado em cultura. Em 1974, Austwick & Copland observaram que o microrganismo isolado de eqüinos com “swamp cancer” em Papua Nova Guiné produziam zoósporos biflagelados ao serem transferidos para um meio aquoso. Baseados nessa característica, os autores o classificaram como um fungo da família *Pythiaceae*, ordem *Peronosporales* e o incluíram no gênero *Pythium*. Entretanto, falharam em estabelecer o nome científico para o isolado (MENDOZA *et al.*, 1996). No Japão, Ichitani & Amemiya (1980), comparando um isolado de eqüino com outras espécies de *Pythium*, através de suas características reprodutivas sexuadas e assexuadas, identificaram o agente como *Pythium gracile*. Somente De Cock *et al.*

(1987), ao analisarem isolados de equinos da Costa Rica, Papua Nova Guiné e Japão, e de caninos dos Estados Unidos, concluíram que todos apresentavam as mesmas características, sendo então classificados como *Pythium insidiosum*. Concomitante a este estudo, Shipton (1987) analisando isolados provenientes de equinos na Austrália, propôs uma nova espécie, então denominada *Pythium destruens*. Entretanto, Mendoza *et al.* (1987) avaliaram a relação antigênica entre amostras de *Pythium insidiosum* isoladas de animais e *Pythium* spp isolado de plantas e solo, utilizando a técnica de imunodifusão e anticorpos fluorescentes. Demonstraram que os isolados provenientes de caninos, equinos e humanos foram idênticos entre si e diferentes das amostras de plantas e solo. Neste trabalho, os autores confirmaram que *Pythium gracile* era antigenicamente idêntico ao *Pythium insidiosum*. Posteriormente, Mendoza & Marin (1989), comprovaram que *Pythium insidiosum* e *Pythium destruens* apresentavam o mesmo perfil antigênico. Desta forma, estabeleceu-se a nomenclatura definitiva do agente da pitiose como *Pythium insidiosum*.

Mesmo estando estabelecida a nomenclatura do agente, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes. Conforme De Cock *et al.* (1987), os oomicetos são seres eucariotos produtores de zoósporos biflagelos, característica comum ao *Pythium insidiosum*, que o incluía na ordem *Peronosporales*, filo *Oomycota* e reino *Protoctista*. Entretanto, Mendoza *et al.* (1996), baseados nos estudos de classificação e características do reino *Protoctista*, sugeriram que *Pythium insidiosum* fosse classificado no reino *Chromista*, filo *Pseudo-fungi*, classe *Oomycetes*, ordem *Pythiales* e família *Pythiaceae*. Todavia, estudos de classificação fúngica, utilizando sistemática filogenética e análises moleculares, dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: *Fungi*, *Stramenipila* e *Protista* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Levando em consideração essa nova classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao Reino *Stramenipila*, Filo *Oomycota*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* e Espécie *insidiosum* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Os estudos de relação filogenética entre organismos vivos, utilizando a comparação na seqüência de ácidos nucleicos da subunidade do RNA ribossomal (rRNA), demonstraram que os microrganismos pertencentes ao filo *Oomycota* estavam filogeneticamente distantes dos membros do Reino *Fungi* e mais proximamente relacionados às algas (KWON-CHUNG, 1994). Desta forma, diferentemente dos fungos verdadeiros, os oomicetos, caracterizam-se por apresentar reprodução assexuada com

produção de zoósporos biflagelados; reprodução sexuada oogâmica com formação de oosporos; parede celular constituída por glucanas, celulose e aminoácido hidroxiprolina; talo diplóide; mitocôndria com crista tubular e síntese do aminoácido lisina através de uma rota alternativa (MOORE-LANDECKER, 1996; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Dentre essas particularidades dos oomicetos, a composição da parede celular é a característica mais comumente utilizada na diferenciação desses microrganismos, uma vez que é composta predominantemente de  $\beta$  (1,3) e  $\beta$  (1,6) glucanas e celulose ao invés de quitina, como é o caso dos fungos. Notáveis diferenças são também observadas quanto à presença do ergosterol na membrana citoplasmática, o qual está ausente nos microrganismos incluídos no *Oomycota*, e em vários aspectos do metabolismo dos esteróis. Na verdade, os oomicetos consistem de dois grupos básicos de microrganismos; àqueles que são capazes de sintetizar esteróis a partir do mevalonato e àqueles que não podem sintetizar esteróis, como é o caso da maioria das espécies patogênicas para plantas, incluindo *Pythium insidiosum* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Hendrix (1970) observou que em espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium* e *Phytophthora*, os esteróis do ambiente eram incorporados à membrana, ao invés de serem sintetizados como ocorre com os fungos verdadeiros. Em geral, esses esteróis são requeridos para a produção *in vitro* de estruturas reprodutivas, mas não necessariamente para o crescimento das hifas vegetativas (GROOTERS, 2003).

## **2.2 *Pythium insidiosum***

O gênero possui mais de 120 espécies distribuídas no mundo inteiro, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas. Espécies de *Pythium* são a principal causa da doença *damping-off* em plantas, causando sérios prejuízos na produção agrônômica. Algumas poucas espécies têm a capacidade de parasitar fungos e larvas de mosquito, enquanto apenas a espécie *Pythium insidiosum* é conhecida como patógeno de mamíferos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Similar a outros oomicetos, *Pythium insidiosum* cresce facilmente em uma variedade de meios de cultura. Em agar farinha de milho (CMA), as colônias apresentam-se transparentes ou esbranquiçadas, submersas com curto micélio aéreo e padrão delicadamente radiado. O diâmetro das hifas cenocíticas varia entre 4 e 10  $\mu\text{m}$  (micrômetros) com ramificações perpendiculares laterais em ângulo reto. Septos são ocasionalmente observados em hifas jovens, porém são abundantes em culturas velhas

(DE COCK *et al.*, 1987; MENDOZA *et al.*, 1996).

A produção de estruturas assexuadas (zoosporângios e zoósporos) pode ser obtida quando *Pythium insidiosum* é cultivado em meio líquido a 28-37°C. A formação e liberação de zoósporos em *Pythium* é um processo fascinante de ser observado ao microscópio. Nos estágios iniciais da formação dos zoosporângios não é possível diferenciá-lo da hifa vegetativa, uma vez que apenas observa-se o entumescimento da extremidade da hifa com a formação de uma pequena vesícula. Posteriormente, a movimentação de fluxo citoplasmático dirigindo-se do interior da hifa em direção a vesícula, culmina na formação dos zoosporângios. Estes são hialinos, globosos e medem cerca de 20-60 µm em diâmetro. Por meio de clivagem progressiva, zoósporos biflagelados são formados no interior dos zoosporângios. Todo o processo de desenvolvimento, desde a formação de zoosporângios não diferenciados até a liberação dos zoósporos, requer aproximadamente 35 minutos. Os zoósporos mecanicamente rompem a parede do zoosporângio, sendo liberados. Nadam em movimentos espirais ou helicoidais em diferentes direções, por aproximadamente 20 minutos e então se encistam. Os zoósporos são do tipo secundário com forma reniforme apresentando um flagelo anterior (que gera o impulso) e um flagelo posterior (responsável pela direção) originados de um sulco ventral ou lateral. Após encistamento, os flagelos são destacados e os zoósporos tornando-se globosos emitindo tubo germinativo (DE COCK *et al.*, 1987; MENDOZA *et al.*, 1993; MENDOZA *et al.*, 1996).

Diferente de outras espécies de *Pythium*, somente poucos isolados de *Pythium insidiosum* produziram estruturas de reprodução sexuada *in vitro* (DE COCK *et al.*, 1987). Quando oogônia é produzida, apresenta-se intercalar, lisa e subglobosa medindo 23 a 30 µm de diâmetro. Um, dois, ou raramente, três anterídios por oogônia podem ser observados. Estes são originados por hifas diferentes daquelas que originam as oogônias e apresentam forma tubular, medindo de 11 a 37 x 6 a 10 µm. A extremidade do anterídio produz um tubo de fertilização que penetra na parede da oogônia. Os oósporos são apleróticos, ou quase pleróticos, medindo em torno de 20 a 25 µm de diâmetro (DE COCK *et al.*, 1987).

Até o momento, *Pythium insidiosum* é a única espécie do gênero com capacidade de infectar mamíferos (MENDOZA *et al.*, 1996). Embora Mendoza *et al.* (1987) e Mendoza *et al.* (1992a) não tenham demonstrado diferenças entre isolados de *Pythium insidiosum* de diferentes origens geográficas através das técnicas de imunodifusão,



anticorpos fluorescentes e imunoblot, Schurko *et al.* (2003a), ao avaliarem o parentesco entre 28 isolados de *Pythium insidiosum* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas (Américas, Ásia e Austrália) pela comparação dos genes do espaço ribossomal intergênico (região IGS), demonstraram haver variações genéticas entre os isolados de *Pythium insidiosum* das regiões avaliadas. Esse estudo agrupou os diferentes isolados em três *clusters*. No *cluster* I estão os isolados de *Pythium insidiosum* provenientes das Américas; no *cluster* II encontram-se agrupados os isolados da Ásia e Austrália e no *cluster* III, que foi o mais distante geneticamente, estão incluídos dois isolados provenientes da Tailândia e um dos Estados Unidos. A partir desses resultados, os autores acreditam na probabilidade de uma reclassificação como subespécies ou mesmo em espécies diferentes. Essas observações foram posteriormente confirmadas por Schurko *et al.* (2003b) ao avaliarem a relação filogenética utilizando a análise da sequência da região transcrita interna do rDNA (região ITS) dos mesmos isolados de *Pythium insidiosum* avaliados anteriormente. Além desses encontros, a identificação de diferentes antígenos imunodominantes em isolados de *Pythium insidiosum* provenientes de diferentes espécies por Mendoza *et al.* (1992a); Vanittanakom *et al.* (2004); Leal *et al.* (2005); Pérez *et al.* (2005) e Krajaejun *et al.* (2006b) e a heterogeneidade genética encontrada por Pannanusorn *et al.* (2007) entre amostras de *Pythium insidiosum* isoladas de pitiose humana na Tailândia, reforçam a existência de variabilidade antigênica e genética deste microrganismo.

## 2.3 Pitiose

### 2.3.1 Epidemiologia

A pitiose é descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, tendo sido relatada na Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua Nova Guiné, Tailândia (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996; MENDOZA *et al.*, 1996; MENDOZA & NEWTON 2005), Venezuela (PÉREZ *et al.*, 2005) e África (RIVIERRE *et al.*, 2005) afetando diversas espécies domésticas e selvagens e também humanos. No Brasil, a pitiose foi descrita em equinos, bovinos, ovinos, caninos e humanos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em equinos. O primeiro relato da enfermidade nesta espécie foi realizado por Santos & Londero (1974), ao avaliarem a histopatologia de

lesões tumorais do tecido subcutâneo de eqüinos no Rio Grande do Sul. Desde então, várias descrições da doença em diferentes Estados do Brasil, incluindo Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará e Paraíba, comprovam a existência da pitiose eqüina em todo o País (CARVALHO *et al.*, 1984; SANTOS *et al.*, 1987; MEIRELES *et al.*, 1993; MORAL *et al.*, 1997; TÚRY & COROA, 1997; MONTEIRO, 1999; TABOSA *et al.*, 1999; SANAVRIA *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2001a; REIS *et al.*, 2003; SALLIS *et al.*, 2003; HEADLEY & ARRUDA, 2004; DALTO *et al.*, 2007; PEDROSO *et al.*, 2007). Segundo Mendoza *et al.* (1996), o Pantanal brasileiro é provavelmente o local de maior freqüência de pitiose eqüina do mundo. Embora não exista um levantamento preciso da incidência da enfermidade no Brasil, a pitiose eqüina representa um problema à eqüinocultura, especialmente em regiões alagadiças como o Pantanal (LEAL *et al.*, 2001b). Além dos casos descritos em eqüinos, o primeiro relato de pitiose cutânea canina no Brasil foi feito por Larsson *et al.* (1997) no Estado de São Paulo. Posteriormente, quatro casos de pitiose gastrointestinal foram descritos no Rio Grande do Sul (RIET-CORREA *et al.*, 1998; RECH *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2006; PAVARINI *et al.*, 2007). No Paraná, Paiva *et al.* (2007) identificaram *Pythium insidiosum* em um canino com gastrite ulcerativa. Em bovinos, Santurio *et al.* (1998) relataram a ocorrência de pitiose no Pantanal Mato-grossense e, recentemente, a enfermidade foi diagnosticada no município de Itaquí, Rio Grande do Sul (informação verbal)<sup>1</sup>. O primeiro relato de pitiose ovina no mundo foi descrito por Tabosa *et al.* (2004) em ovinos deslanados na Paraíba. Posteriormente, Santurio *et al.* (2007) relataram casos de rinite granulomatosa causada por *Pythium insidiosum* em ovinos na região central do País. Já em humanos, apenas um caso de pitiose subcutânea foi descrito por Bosco *et al.* (2005) no Estado de São Paulo.

Nas infecções por *Pythium insidiosum* não se observa predisposição por sexo, idade ou raça e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre os animais ou entre animais e humanos (MENDOZA *et al.*, 1996). Comumente, observa-se que os animais afetados permanecem por longos períodos em contato com águas paradas em lagos, açudes ou locais pantanosos (CHAFIN *et al.*, 1995).

---

<sup>1</sup> Informação fornecida por Janio Morais Santurio, Universidade Federal de Santa Maria, em setembro de 2007.

Como *Pythium insidiosum* é um microrganismo essencialmente aquático, é sugestivo que os zoósporos desempenhem o papel de propagadores do agente, sendo liberados periodicamente em água pantanosas (MENDOZA, 1987). De acordo com Miller & Campbell (1982a), temperaturas entre 30 e 40°C e acúmulo de água em banhados e lagoas, parecem ser fatores essenciais que influenciam a produção de zoósporos condicionando a ocorrência da enfermidade. Os autores acreditam que estas condições sejam determinantes, uma vez que casos de pitiose normalmente são observados durante ou após a estação chuvosa. Essas características epidemiológicas foram bem observadas no Pantanal Mato-grossense, onde a maioria dos casos de pitiose eqüina foi registrada entre os meses de fevereiro e maio (verão-outono), período que corresponde ao ápice das cheias (LEAL *et al.*, 2001a), na Paraíba por Tabosa *et al.* (1999) ao observarem que os 38 casos de pitiose relatados foram registrados nos meses de julho a outubro, sete a dez meses após o início das chuvas na região e por Santos *et al.* (1987) no Rio Grande do Sul ao observarem a ocorrência de 12 casos de pitiose eqüina nos meses mais quentes do ano (janeiro-março).

### 2.3.2 Ciclo de vida do *Pythium insidiosum*

Segundo Mendoza *et al.* (1996), *Pythium insidiosum* requer ambiente aquático com baixas concentrações de íons, pH próximo da neutralidade e uma planta como hospedeiro para manter seu ciclo na natureza. A ocorrência da enfermidade em áreas alagadiças pode ser explicada pelo ciclo ecológico do *Pythium insidiosum* proposto por Miller (1983). O ciclo se baseia na colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do microrganismo, formando os zoosporângios. Os zoósporos liberados ficam livres na água movimentando-se até encontrar outra planta, onde se encistam e emitem tubos germinativos, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo. Os animais provavelmente se infectam ao entrar em contato com esse ambiente. Segundo os autores, os zoósporos são atraídos por quimiotaxia para pele danificada. Uma vez fixados na ferida, se encistam e emitem tubos germinativos, todavia, o desenvolvimento da lesão irá depender da resistência natural do animal.

### 2.3.3 Patogenia

A patogenia da pitiose não é completamente entendida, em parte porque a doença somente é reproduzida experimentalmente em coelhos (MENDOZA *et al.*, 1996). Segundo Foil (1996), *Pythium insidiosum* é considerado um organismo patogênico, uma vez que a supressão imunológica não é um pré-requisito aparente para a infecção.

A provável patogenia da doença foi inicialmente proposta por Mendoza *et al.* (1996), sendo posteriormente esclarecida e ampliada por Mendoza *et al.* (2003). Esses autores acreditam que quando o hospedeiro entra em contato com zoósporos de *Pythium insidiosum*, este forma um tubo germinativo que penetra mecanicamente no tecido. Estudos têm demonstrado que a atração dos zoósporos por pêlos, tecido animal e vegetal é decorrente da presença de substâncias secretadas por esses tecidos (MENDOZA *et al.*, 1993). Mendoza *et al.* (1993) observaram que após o encistamento do zoósporo, o mesmo secreta uma substância amorfa que o recobre, sendo provavelmente produzida em resposta ao fator quimiotático do hospedeiro. Segundo esses autores, essa substância, que pode ser uma glicoproteína, age como um adesivo para ligar o zoósporo à superfície do hospedeiro, permitindo a formação de tubo germinativo, constituindo-se assim, num importante fator de virulência do patógeno. Mendoza & Newton (2005) baseados nos estudos de Ravishankar *et al.* (2001) afirmam que *Pythium insidiosum* não é capaz de invadir a pele intacta. Estudos realizados *in vitro* demonstraram que os ápices das hifas de *Pythium insidiosum* exerceram forças de 6,9 $\mu$ N quando testado contra diferentes superfícies, incluindo pele humana e animal. Porém, observaram que esta força não foi suficiente para penetrar a pele intacta, mostrando, portanto, que este patógeno requer lesões prévias na pele para infectar os tecidos do hospedeiro. Em contrapartida, demonstraram que este microrganismo pode reduzir a resistência tecidual através da secreção de proteases (RAVISHANKAR *et al.*, 2001). Resultados similares foram encontrados por MacDonald *et al.* (2002). Recentemente, Davis *et al.* (2006) comprovaram que três diferentes espécies de *Pythium*, incluindo *Pythium insidiosum*, foram capazes de secretar significativas quantidades de proteases. Já Santurio *et al.* (1998), acreditam na possibilidade de penetração dos zoósporos através dos folículos pilosos, baseados na detecção de hifas no interior do folículo de bovinos infectados naturalmente e no fato da quimiotaxia ser mais ativa na região do pêlo encontrada dentro

do folículo piloso, questionando a necessidade de lesão na pele para que ocorra a germinação dos zoósporos.

Uma vez nos tecidos, as hifas liberam exoantígenos que provocam uma reposta imune com estimulação da subpopulação de linfócitos Th2, e, portanto, com presença de eosinófilos, mastócitos, IgE, interleucina 4 e interleucina 5 (MENDOZA *et al.*, 2003). A grande quantidade de eosinófilos degranulados, que provoca a reação de Splendore-Hoeppli, e mastócitos em torno das hifas é responsável pelas lesões observadas nos tecidos. Nos eqüinos essa reação exacerbada dá origem a formação de estruturas semelhantes a corais denominadas *kunkers* (MENDOZA *et al.*, 1996). Provavelmente, a reação de Splendore-Hoeppli e a secreção de exoantígenos sejam estratégias evolutivas desenvolvidas pelo *Pythium insidiosum* que assegura a sua proliferação tecidual. Esta hipótese é suportada pelo fato que hifas viáveis somente são encontradas dentro da reação eosinofílica ou no interior dos *kunkers*, indicando que *Pythium insidiosum* pode utilizar o fenômeno de Splendore-Hoeppli e *kunkers* para sobreviver (MENDOZA *et al.*, 1996; MENDOZA *et al.*, 2003).

#### 2.3.4 Pitiose em eqüinos

Segundo De Cock *et al.* (1987), o termo pitiose foi proposto em 1980 por Chandler como um nome mais apropriado, uma vez que a doença em eqüinos era denominada por diferentes nomes como hifomicose, zigomicose, dermatite granular, *bursattee*, *Florida leeches*, granuloma ficomicótico e *swamp cancer*. No Brasil, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul a enfermidade é conhecida como “ferida brava”, “ferida da moda” ou “mal dos pântanos” (CARVALHO *et al.*, 1984).

Na espécie eqüina as lesões cutâneas são as mais freqüentes e atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal, provavelmente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos (MILLER & CAMPBELL, 1982a; CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDOZA *et al.*, 1996). Entretanto, lesões também podem ser observadas na face, cavidade nasal e oral, assim como podem disseminar-se para linfonodos regionais, ossos adjacentes e pulmões (FOIL, 1996).

O período de incubação da doença não está bem definido, mas acredita-se que varie de alguns dias a várias semanas (MILLER & CAMPBELL, 1982a, SANTOS *et al.*,

1987; TABOSA *et al.*, 1999; SALLIS *et al.*, 2003). Alfaro & Mendoza (1990) citam que dois dias após a penetração do zoósporo na pele, pode-se observar um aumento de volume da região de 5 mm (milímetros) de diâmetro que aumenta rapidamente, podendo atingir 10 a 20 cm (centímetros) em duas semanas.

Os sinais clínicos caracterizam-se pelo desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, que evoluem rapidamente, formando grandes massas teciduais que podem variar de 5 a 500 mm de tamanho, de bordas irregulares e aparência tumoral. No interior da lesão, observa-se abundante tecido conjuntivo fibroso de consistência firme e brancacento, entrecortado por galerias (*sinus*) preenchidas por massas branco-amareladas de 2 a 10 mm de diâmetro, de aspecto arenoso e ramificadas, que se desprendem facilmente do tecido circunjacente (*kunkers*). Estes são constituídos por vasos sangüíneos que sofreram necrose de coagulação e hifas de *Pythium insidiosum* recobertas por células necróticas (SANTOS *et al.*, 1987; CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDOZA *et al.*, 1996). O tamanho das lesões depende da sua localização e tempo de evolução da infecção. Normalmente observa-se secreção de exsudato serosanguinolento, mucosanguinolento, hemorrágico e às vezes mucopurulento fluindo através dos *sinus*. Prurido é freqüente e os animais afetados normalmente mutilam a lesão na tentativa de aliviar o desconforto (MILLER & CAMPBELL, 1982a; CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDOZA *et al.*, 1996). A maioria dos casos descritos relata apenas uma lesão em cada animal, porém podem existir lesões cutâneas multifocais (MILLER & CAMPBELL, 1982a; MENDOZA & ALFARO, 1986; CHAFFIN *et al.*, 1992). Leal *et al.* (2001a), relataram casos atípicos de pitiose eqüina no pantanal brasileiro. Nestes casos, os animais apresentavam lesões subcutâneas de curso clínico superior a um ano, localizadas nos membros, face e porção ventral da parede tóraco-abdominal, caracterizadas por grandes massas tumorais circunscritas, às vezes pedunculadas, recobertas com pele escurecida e engrossada, sem ulcerações e com pouca secreção. Ao pressionar-se a lesão, *kunkers* eram facilmente extraídos, de onde se podia isolar *Pythium insidiosum*. Os eqüinos com tais lesões atípicas não apresentavam emagrecimento progressivo e, após um ano de observação, as lesões permaneciam do mesmo aspecto e tamanho. Segundo os autores, somente no Pantanal brasileiro foram registradas estas formas atípicas da pitiose nos eqüinos.

Na maioria dos casos de pitiose cutânea, os linfonodos regionais encontram-se aumentados de volume. Entretanto, metástases para linfonodos cervicais inferiores,

inguinais e submandibulares somente foram observadas por Connole (1973); Murray *et al.* (1978); Leal *et al.* (1997) e Miller & Campbell (1984).

Lesões de pitiose no intestino constituem-se na segunda forma mais freqüente da infecção em eqüinos. Os casos relatados descrevem episódios de cólica e presença de massas tumorais com diminuição e/ou obstrução do lúmen intestinal. Os achados de necropsia e excisão cirúrgica revelam ulceração intestinal e presença de massas nodulares localizadas na parede do jejuno (BROWN & ROBERTS, 1988; ALLISON & GILLIS, 1990; MORTON *et al.*, 1991; PURCELL *et al.*, 1994; DALTO *et al.*, 2007). Além dos relatos de pitiose cutânea e intestinal, pitiose pulmonar foi descrita por Pecquet-Goad (1984) em um eqüino que apresentava tosse e descarga nasal sanguinolenta um ano após tratamento de uma lesão cutânea em um dos membros e Reis *et al.* (2003), detectaram infecção generalizada em três animais, com lesões localizadas principalmente nos pulmões e fígado. Alfaro & Mendoza (1990) acreditam que o envolvimento ósseo somente ocorra em casos de pitiose crônica. Nos casos descritos, foram observadas lesões crônicas localizadas nos membros e ao exame radiológico, ficou evidenciado exostose, osteólise e osteomielite (MENDOZA *et al.*, 1988; ALFARO & MENDOZA, 1990; EATON, 1993).

A histopatologia da pele de eqüinos afetados revela a presença de úlceras acompanhadas por acantose, paraqueratose e papilomatose, podendo constituir-se numa hiperplasia pseudoepiteliomatosa. A derme apresenta abundantes áreas necróticas (microabscessos), com reação inflamatória composta basicamente de eosinófilos, células plasmáticas, neutrófilos, alguns linfócitos e macrófagos (MENDOZA, 1987). Segundo Miller & Campbell (1984), as lesões histológicas caracterizam-se pela formação de coágulos eosinofílicos encontrados no interior de tecido fibroso e inflamação granulomatosa. Os *kunkers*, observados na macroscopia, correspondem aos coágulos eosinofílicos que são compostos de hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, especialmente eosinófilos. Em torno das hifas, os eosinófilos encontram-se degenerados e em direção a periferia os grânulos tornam-se mais evidentes, sendo comum encontrar-se eosinófilos intactos na periferia da lesão. A área ao redor do coágulo é composta por um espesso exsudato inflamatório rico em neutrófilos e eosinófilos, podendo apresentar ocasionalmente células gigantes e macrófagos. Em lesões crônicas observa-se marcada fibrose com redução do número de células inflamatórias. A formação de depósitos eosinofílicos em torno das hifas, produzindo o fenômeno de Splendore-Hoeppli também

pode ser observada (MILLER & CAMPBELL, 1984; MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES *et al.*, 1993). Hifas de *Pythium* não coram bem em colorações de Hematoxilina & Eosina, sendo identificadas como imagens negativas delimitadas por ampla bainha eosinofílica associada à parede da hifa. Entretanto, em cortes corados com coloração especial de prata (Grocott), as hifas são evidenciadas na periferia das áreas de necrose com paredes espessas marrom-escuras, esparsamente septadas, irregularmente ramificadas (normalmente em ângulo reto) e medindo de 2 a 6 µm de diâmetro (MILLER & CAMPBELL, 1984; CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996). Os achados histopatológicos nos casos de localização intestinal variaram desde a presença de tecido conjuntivo fibroso com áreas de necrose de coagulação e focos de mineralização contendo hifas, macrófagos e neutrófilos degenerados, sem infiltrado eosinofílico (BROWN & ROBERTS, 1988) ao granuloma eosinofílico crônico com presença de hifas de *Pythium insidiosum* identificadas por imunohistoquímica (ALLISON & GILLIS, 1990; MORTON *et al.*, 1991; PURCELL *et al.*, 1994, DALTO *et al.*, 2007).

### 2.3.5 Pitiose em caninos

Em seqüência aos eqüinos, a espécie canina é a segunda mais freqüentemente infectada por *Pythium insidiosum*. A pitiose canina apresenta duas formas clínicas distintas: cutânea e gastrointestinal, sendo a última, a forma clínica mais prevalente nesta espécie. Cursa com distúrbios digestivos como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia e presença de massas nodulares, evidenciadas à palpação abdominal (MILLER *et al.*, 1983; MILLER, 1985; BENTINCK-SMITH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; RIET-CORREA *et al.*, 1998; HELMAN & OLIVER, 1999; LILJEBJELKE *et al.*, 2002; GROOTERS, 2003, MENDOZA *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006; PAVARINI *et al.*, 2007). A maioria dos cães afetados é proveniente de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados como açudes e banhados (FOIL *et al.*, 1984; BENTINCK-SMITH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; PATTON *et al.*, 1996; HELMAN & OLIVER, 1999; DYKSTRA *et al.*, 1999; GROOTERS, 2003; RIVIERRE *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006; PAVARINI *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2007). Geralmente afeta cães de grande porte e com idade inferior a três anos (MILLER, 1985; FISCHER *et al.*, 1994; THOMAS & LEWIS, 1998; GROOTERS, 2003; RECH *et al.*,



2004). As lesões gastrointestinais caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino com ulceração variável da mucosa (MILLER, 1985; FISCHER *et al.*, 1994; HELMAN & OLIVER, 1999; GROOTERS, 2003; RECH *et al.*, 2004; MENDOZA *et al.*, 2005; PAIVA *et al.*, 2007). Miller (1985) descreve que em lesões crônicas, o pâncreas, útero, linfonodos mesentéricos e vasos linfáticos também podem ser afetados. Além da localização intestinal, dois casos de esofagite crônica foram relatados por Patton *et al.* (1996); e Helman & Oliver (1999) descreveram lesão orofaríngea, envolvendo a laringe e esôfago cranial. Já, Jaeger *et al.* (2002), observaram um caso de abscesso na próstata causado por *Pythium insidiosum* com infecção adjacente ao cólon.

As lesões cutâneas geralmente se localizam nas extremidades, base da cauda, períneo e face, aumentam rapidamente de tamanho, ulceram e apresentam múltiplos tratos fistulosos (THOMAS & LEWIS, 1998; GROOTERS, 2003). Comumente observa-se uma única lesão. Entretanto, múltiplas lesões foram relatadas por Dykstra *et al.* (1999); Foil *et al.* (1984) e Hensel *et al.* (2003). Um único caso de pitiose sistêmica foi descrito por Foil *et al.* (1984) com disseminação para intestinos, rins, coração e córtex cerebral. Na maioria dos relatos as lesões são indolores e não pruriginosas (DYKSTRA *et al.*, 1999; HOWERTH *et al.*, 1989; HENSEL *et al.*, 2003), no entanto, prurido foi observado em três cães (FOIL *et al.*, 1984). Thomas & Lewis (1998) citam que em muitos casos o intenso prurido determina a automutilação das lesões, o que é similar aos eqüinos.

Na necropsia, as lesões intestinais caracterizam-se pelo espessamento da região afetada e presença de massas tumorais que determinam o estreitamento da luz intestinal. Ao corte, a mucosa e submucosa encontram-se espessadas e salpicadas por múltiplos nódulos amarelados. Na histopatologia, observa-se que as lesões localizam-se preferencialmente na mucosa e submucosa, sendo compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, circundadas por infiltrado inflamatório composto de eosinófilos, plasmócitos, macrófagos epitelióides, células gigantes e presença de hifas nos focos necróticos, melhor visualizadas quando coradas por Grocott (MILLER *et al.*, 1983; MILLER, 1985; FISCHER *et al.*, 1994; LILJEBJELKE *et al.*, 2002; RECH *et al.*, 2004, MENDOZA *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006; PAVARINI *et al.*, 2007). Em algumas ocasiões podem-se observar reações de Splendore-Hoeppli (FISCHER *et al.*, 1994). Já, as lesões cutâneas apresentam-se como dermatite granulomatosa a piogranulomatosa ulcerativa, contendo áreas de necrose

infiltrada por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos contendo hifas em seu interior, estando delimitados por neutrófilos, macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas (FOIL *et al.*, 1984).

### 2.3.6 Pitiose em felinos

Em gatos, a doença é menos freqüente, havendo poucas descrições na literatura. O primeiro relato refere-se a uma infecção nasal e retrobulbar em um gato nos Estados Unidos (BISSONNETTE *et al.*, 1991). O animal apresentava uma massa tumoral que invadia a nasofaringe, estendendo-se às órbitas e provocando exoftalmia e osteólise do palato duro. A histopatologia revelou tecido fibroso infiltrado por eosinófilos, macrófagos e grandes linfócitos e presença de hifas de *Pythium insidiosum* identificadas por imunofluorescência.

Foil (apud MENDOZA *et al.*, 1996) mencionou a ocorrência de vários casos de pitiose em gatos na Flórida e Thomas & Lewis (1998) relataram quatro casos de pitiose cutânea com lesões nos membros, abdômen e região inguinal. Estes mesmos autores descreveram lesões com manifestações clínicas diferentes em dois gatos, caracterizadas por grandes massas subcutâneas na região distal dos membros, sem envolvimento cutâneo. Grooters (2003) observou, desde 1999, a ocorrência de 10 casos de pitiose subcutânea afetando gatos entre quatro meses e nove anos de idade. As lesões caracterizaram-se por massas subcutâneas, algumas invasivas, localizadas na região inguinal, base da cauda e região periorbital. Em alguns casos as lesões eram nodulares e supurativas e em outros se assemelhavam a placas ulceradas, estando localizadas nas extremidades, principalmente nos dígitos ou almofada plantar.

Recentemente, Rakich *et al.* (2005) relataram dois casos de pitiose gastrointestinal em felinos. Os animais apresentavam perda de peso, vômito e presença de uma massa palpável na região abdominal. Em ambos os casos, a massa apresentava localização extraluminal no duodeno e íleo. Na avaliação histopatológica evidenciou-se enterite granulomatosa eosinofílica, envolvendo as camadas muscular e serosa, com áreas multifocais de necrose, no interior das quais havia a presença de hifas de *Pythium insidiosum*.

### 2.3.7 Pitiose em bovinos

Em bovinos, a pitiose foi primeiramente descrita na região da Louisiana, EUA afetando 6 animais (MILLER *et al.*, 1985). Posteriormente, Santurio *et al.* (1998) relataram a ocorrência da enfermidade no Brasil, na região do Pantanal, acometendo dois bovinos e recentemente, no Rio Grande do Sul, afetando 78 animais (informação verbal)<sup>1</sup>. Na Venezuela, Pérez *et al.* (2005) diagnosticaram pitiose enzoótica em 63 bovinos num período de dois anos de estudo.

Em todos os casos havia a presença de lesões cutâneas, geralmente localizadas nos membros, caracterizadas por ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada. Prurido e claudicação foram observados nos casos descritos por Pérez *et al.* (2005). Em nenhum dos relatos observou-se presença de *kunkers*. Em todos os casos, os animais afetados permaneciam em regiões alagadiças e a enfermidade foi observada nos meses mais quentes do ano, afetando bovinos entre três meses e um ano de idade. Em seus relatos, Miller *et al.* (1985) e Pérez *et al.* (2005) não especificaram a cura da doença, entretanto, Santurio *et al.* (1998) e Santurio (informação verbal) mencionaram a regressão espontânea das lesões.

Histologicamente, as lesões caracterizaram-se por granulomas dermais multifocais, rodeados por tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, plasmócitos e células gigantes, com presença de hifas de *Pythium insidiosum* no centro dos granulomas (MILLER *et al.*, 1985, SANTURIO *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2005). Nas lesões descritas por Santurio *et al.* (1998), hifas também foram encontradas no interior de folículos pilosos, enquanto que a reação de Splendore-Hoeppli foi observada nos casos relatados por Miller *et al.* (1985) e Pérez *et al.* (2005).

### 2.3.8 Pitiose em ovinos

A primeira descrição de pitiose em ovinos foi relatada por Tabosa *et al.* (2004) no nordeste brasileiro. Em um dos surtos, 40 animais de um rebanho de 120 ovinos deslanados apresentaram a doença, onde já haviam morrido 36 ovinos de diferentes

---

<sup>1</sup> Informação fornecida por Janio Morais Santurio, Universidade Federal de Santa Maria, em setembro de 2007.

idades. No segundo surto, seis ovinos de um rebanho de 80 encontravam-se doentes. Em ambos os casos, os animais permaneciam por longos períodos em locais com águas estagnadas. Os animais afetados apresentaram lesões ulcerativas úmidas ou secas, localizadas nos membros, região ventral do abdômen e região pré-escapular, sem presença de *kunkers*. Foram observadas metástases para o pulmão, linfonodo pré-escapular e osso sesamóide. Recentemente, Santurio *et al.* (2007) descreveram rinite granulomatosa causada por *Pythium insidiosum* em quatro ovinos da raça Santa Inês oriundos de áreas pantanosas do Cerrado brasileiro. A enfermidade ocorreu no período de julho a setembro apresentando curso clínico de 28 a 50 dias. As lesões clínicas caracterizaram-se pelo aumento de volume nasal, epistaxe e presença de fístulas que drenavam exsudato mucopurulento. Na necropsia, havia a presença de áreas multifocais de necrose e osteólise na região frontal do nariz e palato duro.

A histopatologia dos tecidos afetados nesses dois relatos revelou a presença de granulomas multifocais, no centro dos quais se podiam observar hifas delimitadas por reações de Splendore-Hoeppli e infiltrado inflamatório de neutrófilos, eosinófilos, células epitelióides e células gigantes (TABOSA *et al.*, 2004; SANTURIO *et al.*, 2007).

### 2.3.9 Pitiose em coelhos

Segundo Mendoza & Newton (2005) as várias tentativas de reprodução experimental da enfermidade em espécies animais naturalmente infectadas resultaram em insucesso. Entretanto, a doença pode ser reproduzida em coelhos. A primeira reprodução experimental da pitiose nesta espécie foi realizada por Witkamp em 1924 (apud MENDOZA & NEWTON, 2005) ao inocular hifas de *Pythium insidiosum* por via intraperitoneal ou endovenosa. Já Miller & Campbell (1983a), comprovaram a suscetibilidade de coelhos como modelo experimental para a pitiose através da inoculação subcutânea de zoósporos de *Pythium insidiosum*. Os animais inoculados evidenciaram nódulos que evoluíram para fibrogranulomas eosinofílicos com características similares à infecção natural dos eqüinos, havendo o isolamento de *Pythium insidiosum* de algumas lesões. Após 20-30 dias de inoculação os autores constataram abscedação progressiva, porém não ocorreram ulcerações comparáveis com a doença natural nos eqüinos, e tampouco a formação de *kunkers*. No entanto, na avaliação leucocitária, o quadro da pitiose em coelhos foi muito similar aos dos eqüinos, com progressiva leucocitose,

moderada neutrofilia e leve monocitose (MILLER & CAMPBELL, 1983a,b). A histologia das lesões revelou área central de necrose contendo eosinófilos e hifas fúngicas na periferia, delimitada por tecido conjuntivo, o qual se encontrava envolvido externamente por uma bainha assimétrica de macrófagos, células epitelióides e algumas células gigantes contendo hifas em seu interior (MILLER & CAMPBELL, 1983a). Os autores sugeriram que esta espécie poderia ser utilizada como modelo experimental para avaliar agentes antifúngicos contra *Pythium insidiosum*. Os trabalhos de alguns pesquisadores como Santurio *et al.* (2003), que utilizaram coelhos inoculados com *Pythium insidiosum* para avaliar três diferentes formulações usadas para imunoterapia e Leal *et al.* (2002), que avaliaram a resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium insidiosum*, comprovam que esta espécie serve como modelo experimental, tanto para estudos sorológicos como para avaliação de imunoterapia.

### 2.3.10 Pitiose em espécies selvagens

A partir do ano de 2003, quando Grooters diagnosticou lesões cutâneas e gastrointestinais em um grupo de ursos mantidos em cativeiro, o número de relatos de pitiose em espécies não domésticas é crescente.

Em 2004, Camus *et al.* relataram pitiose pulmonar em um jaguar (*Panthera onca*) na América Central e Wellehan *et al.* diagnosticaram pitiose cutânea na face de um dromedário (*Camelus dromedarius*), com lesões metastáticas para linfonodos e estômago. Já Buergelt *et al.* (2006), avaliando clinicamente um tigre de bengala (*Panthera tigris tigris*) que apresentava episódios de vômito, identificaram a presença de uma massa palpável na região abdominal. À necropsia observaram espessamento da região distal do jejuno e cólon com estenose e oclusão do lúmen intestinal. Em todos os casos descritos, a histologia revelou a presença de granulomas eosinofílicos com hifas de *Pythium insidiosum* em seu interior.

### 2.3.11 Pitiose em humanos

As infecções causadas por *Pythium insidiosum* em humanos apresentam formas clínicas que diferem daquelas observadas nos animais, podendo ser classificadas em 3 formas: cutânea, arterial e ocular. A forma cutânea caracteriza-se pelo desenvolvimento

de lesões subcutâneas em pacientes talassêmicos, com achados patológicos de reação granulomatosa, infiltração difusa e edema da parede dos vasos. Já a forma arterial (sistêmica), é caracterizada pelo desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores. A histopatologia evidencia inflamação eosinofílica e invasão dos vasos por hifas de *Pythium insidiosum*. Esta forma é somente encontrada em pacientes talassêmicos e geralmente leva a amputação do membro afetado. A forma ocular manifesta-se como ceratite, podendo ou não estar associada à talassemia. Nesta forma, os pacientes normalmente terminam por realizar ceratoplastia, evisceração ou enucleação (IMWIDTHAYA, 1994; PRASERTWITAYAKIJ *et al.*, 2003; KRAJAEJUN *et al.*, 2006a). A maioria dos casos de pitiose humana foi observada na Tailândia e esporadicamente, nos EUA, Austrália, Haiti, Malásia, Nova Zelândia e Brasil. Os primeiros casos foram relatados por Thianprasit na Tailândia (apud MENDOZA *et al.*, 1996). PRASERTWITAYAKIJ *et al.* (2003) realizaram uma extensa revisão dos casos de pitiose humana descritos na literatura, incluindo todos os principais relatos. Encontraram descritos 32 casos, sendo 25 relatados na Tailândia (78%) e os demais nos EUA, Austrália, Haiti, Malásia e Nova Zelândia. Vinte pacientes de 21 com ocupação conhecida eram fazendeiros e 23 indivíduos de 28 eram talassêmicos. Nove pacientes (28%) desenvolveram a forma de ceratite com ulceração da córnea, sendo realizada ceratoplastia em todos os afetados. Cinco (15%) apresentaram a forma subcutânea e foram submetidos à excisão cirúrgica da lesão e tratamento com antifúngicos, respondendo bem a terapia. Dezesete pacientes (53%) desenvolveram a forma sistêmica, sendo todos provenientes da Tailândia. Destes, 16 sofreram amputação do membro afetado e oito vieram a óbito. A evolução desses casos demonstra a gravidade da pitiose arterial em humanos. Similarmente, Krajaejun *et al.* (2006a) revisando os relatos de pitiose humana descritos na Tailândia no período de 1985-2003 encontraram descritos 102 casos de pitiose com frequências e características similares àquelas já relatadas por Prasertwitayakij *et al.* (2003). Na Tailândia, observa-se que dois fatores contribuem para importância da pitiose humana: a prevalência da  $\alpha$  e  $\beta$  talassemia e presença de grandes áreas alagadiças utilizadas para agricultura (TRISCOTT *et al.*, 1993; IMWIDTHAYA, 1994; KRAJAEJUN *et al.*, 2006a). Além disso, no estudo realizado por Supabandhu *et al.* (2007), confirmou-se que os reservatórios de água utilizados para irrigação de lavouras na Tailândia constituem-se na principal fonte de infecção do *Pythium insidiosum*, uma vez que este agente foi recuperado com alta frequência desses ambientes. Mendoza *et al.* (2004) ao realizarem uma revisão de casos

de ceratite em crianças nos EUA, no período de 1900-1987, encontraram que cinco casos descritos como ceratite fúngica, foram consistentes com lesões causadas por *Pythium insidiosum*. No Brasil, a pitiose humana ainda não havia sido relatada até 2005, quando Bosco *et al.*, descreveram o primeiro caso de pitiose cutânea em um paciente do sexo masculino no Estado de São Paulo.

## 2.4 Diagnóstico

### 2.4.1 Diagnóstico microbiológico

O diagnóstico presuntivo de pitiose é realizado levando-se em consideração a epidemiologia, sinais clínicos e aspectos macro e microscópicos das lesões. O isolamento e identificação do agente são de grande valor para o diagnóstico definitivo e diferencial, uma vez que a pitiose em eqüinos deve ser diferenciada de habronemíase cutânea, zigomicoses (especialmente conidiobolomicose e basidiobolomicose), neoplasias, como carcinoma de células escamosas e sarcóide, tecido de granulação exuberante e granulomas bacterianos (CHAFFIN *et al.*, 1995; GROOTERS *et al.*, 2002a). Já em caninos, o diagnóstico diferencial deve incluir infecções causadas por zigomicetos e oomicetos do gênero *Lagenidium* (GROOTERS *et al.*, 2003) e em ovinos, especialmente as lesões nasais, devem ser diferenciadas de conidiobolomicose (SANTURIO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007).

Grooters *et al.* (2002a) ao avaliar diferentes técnicas para o cultivo de *Pythium insidiosum* a partir de lesões de pitiose em eqüinos, observaram que o sucesso no isolamento foi alto quando biópsias, especialmente *kunkers*, foram imediatamente semeadas em meios de cultura contendo antibióticos. Quando estas amostras foram armazenadas por um a três dias antes de seu processamento, o isolamento foi maior quando as mesmas ficaram armazenadas à temperatura ambiente ou em solução contendo ampicilina. Já, quando esses tecidos ficaram armazenados por quatro a cinco dias antes de seu processamento, o isolamento de *Pythium insidiosum* foi maior quando os *kunkers* ficaram estocados a 4°C. Embora alguns autores cite que a refrigeração pode resultar em morte do *Pythium insidiosum* na amostra (NEWTON & ROSS, 1993; MENDOZA, *et al.*, 1996), os dados obtidos por Grooters *et al.* (2002a), sugerem que a inibição do crescimento bacteriano, que contamina a amostra, aumenta as chances de

isolamento de *Pythium insidiosum* dos tecidos infectados. Para o isolamento, alguns autores sugerem o uso de ágar V8, acrescido de estreptomicina (200µg/mL) e ampicilina (100µg/mL). Entretanto, meios de cultivo como agar Sabouraud, caldo Sabouraud, agar sangue, agar infusão-cérebro-coração (BHI) e agar CMA também podem ser utilizados (CHAFFIN *et al.*, 1995). Pequenos pedaços de tecido fresco, previamente lavados em solução salina ou água destilada estéril, são distribuídos diretamente na superfície do agar, devendo ficar incubado a 37°C, por 24 – 48 horas (MENDOZA *et al.*, 1996). A identificação é realizada através do aspecto da colônia e características das hifas (DE COCK *et al.*, 1987). A produção de zoosporângios e zoósporos deve ser observada para identificação final de *Pythium insidiosum*. Para obtenção de zoósporos *in vitro*, pedaços de folhas de grama (*Paspalum notatum*) previamente esterilizados, são distribuídos sobre cultivos de *Pythium insidiosum* em agar água a 2% e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, os pedaços de folhas infectados são transferidos para uma solução de sais minerais diluída a 1%. Zoosporângios contendo zoósporos móveis são observados nos bordos terminais das folhas, após duas a quatro horas de incubação a 37°C (MENDOZA & PRENDAS, 1988; CHAI PRASERT *et al.*, 1990).

Mesmo sendo possível a correta caracterização de *Pythium insidiosum* através destes métodos, em algumas ocasiões o isolamento não ocorre e a identificação das espécies de *Pythium* não é uma tarefa fácil, pois se baseia nas características morfológicas das estruturas de reprodução assexuada e sexuada (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; MOORE-LANDECKER, 1996) necessitando de técnicos bastante experientes. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas de imunohistoquímica, sorológicas e moleculares facilita, auxilia e suporta um diagnóstico precoce e seguro da enfermidade.

#### 2.4.2 Diagnóstico sorológico

O desenvolvimento de técnicas sorológicas para o diagnóstico e monitoramento da resposta imunológica em eqüinos com pitiose foi impulsionado por Miller & Campbell (1982b). Esses autores desenvolveram as técnicas de imunodifusão em gel de agar (ID), fixação do complemento (FC) e um teste de hipersensibilidade intradérmica (TI), para diagnosticar e avaliar a resposta imune humoral e celular de eqüinos com pitiose. Os



testes realizados em animais com pitiose clínica, diagnosticaram positivamente 100% (ID), 82% (FC) e 64% (TI) dos casos. Esses dados comprovaram que o teste de ID apresentava alta sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos anti-*Pythium insidiosum*. Resultados similares foram obtidos por Mendoza & Alfaro (1986). Mendoza *et al.* (1986) ao avaliar três diferentes antígenos utilizados para o teste de ID, demonstraram melhor sensibilidade e especificidade do teste quando o antígeno foi produzido a partir de filtrados de cultura, e não a partir de antígeno tripsinizado como relatado por Miller & Campbell (1982b). Em 1990, Kaufman *et al.*, demonstraram a eficiência da ID para o soro-diagnóstico das zigomicoses causadas por *Basidiobolus ranarum* e *Conidiobolus coronatus*, assim como para pitiose, em humanos e animais, comprovando a validade do teste para o diagnóstico diferencial destas três micoses. Da mesma forma, Imwidthaya & Srimuang (1989) e Prachartam *et al.* (1991) demonstraram a sensibilidade e especificidade da ID para o diagnóstico e monitoramento da pitiose em humanos. Embora este teste identifique anticorpos no soro da maioria dos eqüinos e humanos infectados, falha na detecção de anticorpos em caninos com doença ativa (GROOTERS, 2003). Similarmente, Pérez *et al.* (2005) ao utilizar o teste de ID para diagnóstico de pitiose em bovinos, constataram que apenas 22,8% dos animais infectados demonstraram reações positivas, sugerindo a insensibilidade desta técnica para o diagnóstico da doença nesta espécie.

Segundo Mendoza *et al.* (2005), um importante passo para identificação de *Pythium insidiosum* em amostras histopatológicas foi o desenvolvimento das técnicas de anticorpos fluorescentes por Mendoza *et al.* (1987) e imunoperoxidase por Brown *et al.* (1988). O teste de imunofluorescência demonstrou especificidade na detecção de hifas nos tecidos de felinos, caninos e humanos, porém em eqüinos, a fluorescência uniforme observada, devido à liberação de antígenos solúveis, impediu a utilização deste teste como diagnóstico nesta espécie (MENDOZA *et al.*, 1996).

A técnica de imunoperoxidase tem sido utilizada com bons resultados no diagnóstico de pitiose em eqüinos (BROWN & ROBERTS, 1988; ALLISON & GILLIS, 1990; MORTON *et al.*, 1991; CHAFFIN *et al.*, 1992; PURCELL *et al.*, 1994; WORSTER *et al.*, 2000; DALTO *et al.*, 2007; PEDROSO *et al.*, 2007), caninos (HOWERTH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; PATTON *et al.*, 1996; HNILICA, 1998; HELMAN & OLIVER, 1999; JAEGER *et al.*, 2002; LILJEBJELKE *et al.*, 2002; PAVARINI *et al.*, 2007), bovinos (SANTURIO *et al.*, 1998), ovinos (TABOSA *et al.*, 2004), humanos (TRISCOTT *et al.*, 1993) e espécies não domésticas (CAMUS *et al.*,

2004). Entretanto, Grooters *et al.* (2003) reportaram reação cruzada em caninos infectados por *Lagenidium* sp., um outro oomiceto muito relacionado ao gênero *Pythium*, e que também causa infecção em cães similares a pitiose.

Mendoza *et al.* (1997) foram pioneiros no desenvolvimento do teste de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) para o diagnóstico de pitiose em animais e humanos. Com esse trabalho, os autores demonstraram que o ELISA utilizado foi eficiente para o diagnóstico da enfermidade, apresentando especificidade semelhante à ID, todavia com melhor sensibilidade, possibilitando a detecção de infecções precoces ou ainda subclínicas. Posteriormente, no Brasil, Rosa *et al.* (1999) desenvolveram um teste de ELISA para o diagnóstico de pitiose equina com resultados similares aos anteriormente descritos. Já Alves *et al.* (2001), avaliaram o desempenho da técnica de “ELISA-conta” na detecção de anticorpos anti-*Pythium insidiosum* no soro de coelhos imunizados e Santurio *et al.* (2006b) descreveram a padronização do teste de ELISA para detecção e monitoramento de anticorpos em coelhos com pitiose experimental e equinos naturalmente infectados. Os dados obtidos em ambos os estudos permitiram inferir que as técnicas utilizadas foram seguras e eficazes no diagnóstico sorológico da doença. ELISA para o diagnóstico precoce de pitiose em caninos (GROOTERS *et al.*, 2002b), humanos (KRAJAEJUM *et al.*, 2002) e bovinos (PÉREZ *et al.*, 2005) também foi desenvolvido e, similar ao teste em equinos e coelhos, apresentou alta sensibilidade e especificidade. Já, Rakich *et al.* (2005) afirmaram que ELISA é útil no diagnóstico da doença em felinos e no monitoramento da terapia.

O teste de Western Blot, desenvolvido por Mendoza *et al.* (1992a), foi introduzido com o objetivo de identificar antígenos imunodominantes de *Pythium insidiosum* durante a infecção. Esta técnica mostrou boa especificidade, sendo útil na identificação dos isótipos de imunoglobulinas em animais com doença ativa (MENDOZA *et al.*, 1996). A utilização deste teste na pitiose bovina identificou 100% dos animais infectados (PÉREZ *et al.*, 2005), assim como também apresentou resultados similares quando aplicado ao diagnóstico da pitiose em humanos (VANITTANAKOM *et al.*, 2004; KRAJAEJUN *et al.*, 2006b). Através desses estudos foram identificados importantes antígenos imunodominantes de *Pythium insidiosum* que diferiram quando avaliados com soro de equinos (MENDOZA *et al.*, 1992a; LEAL *et al.*, 2005); bovinos (PÉREZ *et al.*, 2005; LEAL *et al.*, 2005), humanos (VANITTANAKOM *et al.*, 2004; KRAJAEJUN *et al.*, 2006b) e coelhos (LEAL *et al.*, 2005). Recentemente, o mapeamento de antígenos imunodominantes em hifas de *Pythium insidiosum* realizado por Garcia *et al.* (2007),

revelou que a maioria deles estava localizada nas camadas internas da parede celular e alguns poucos no citosol das hifas.

### 2.4.3 Diagnóstico molecular

Atualmente, as técnicas moleculares se constituem em importantes ferramentas para o diagnóstico, identificação e estudos filogenéticos de *Pythium insidiosum*. Neste contexto, a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) tornou-se uma importante técnica no diagnóstico da pitiose, uma vez que permite a identificação rápida e segura de *Pythium insidiosum* a partir de cultivos ou tecidos infectados. Além disso, Grooters & Gee (2002), ao desenvolverem a técnica de Nested-PCR, utilizando a região ITS-1 do gene rRNA como alvo de amplificação, aumentaram a sensibilidade e especificidade da mesma, tornando-a mais precisa. Desta forma, estas técnicas têm sido bastante difundidas e utilizadas no diagnóstico da doença com resultados seguros (BADENOCH *et al.*, 2000; JAEGER *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2003; CAMUS *et al.*, 2004; WELLEHAN *et al.*, 2004; VANITTANAKOM *et al.*, 2004; BOSCO *et al.*, 2005; MENDOZA *et al.*, 2005; RIVIERRE *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006, SANTURIO *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2007).

De acordo com Schurko *et al.* (2004), as sondas de DNA são bastante utilizadas na identificação de agentes patogênicos, uma vez que podem detectar DNA em culturas mistas, não exigindo a obtenção de culturas puras. No estudo realizado com *Pythium insidiosum* por estes autores, uma sonda de DNA espécie-específica elaborada a partir da região intergênica (IGS-1), situada entre os genes LSU e 5S rRNA do *Pythium insidiosum*, foi utilizada com o objetivo de distinguir o agente de outras espécies de *Pythium* e de outros patógenos que causam doenças com sintomas similares a pitiose. Os resultados obtidos demonstraram que a especificidade da sonda para hibridizar o DNA genômico de todos os isolados de *Pythium insidiosum* testados e a ausência de reatividade cruzada com o DNA de outras espécies de *Pythium* ou outros patógenos similares, torna esta técnica valiosa para o diagnóstico da pitiose.

Já para estudos de identificação de *Pythium insidiosum* e avaliação do parentesco entre isolados provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, Schurko *et al.* (2003a), avaliaram a aplicabilidade do RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) na análise dos genes do rRNA da região IGS. Concluíram que esta

técnica constitui-se numa poderosa ferramenta molecular na identificação de *Pythium insidiosum*, além de fornecer importantes informações de parentesco dos isolados. Entretanto, Schurko *et al.* (2003b) afirmam que embora a análise do RFLP da região IGS forneça informações de variabilidade intraespecífica entre isolados de *Pythium insidiosum*, o seqüenciamento da região ITS permite melhor avaliação da relação filogenética, não somente entre *Pythium insidiosum*, mas também entre outras espécies de *Pythium* e gêneros relacionados, tarefas que não podem ser identificadas através da técnica de RFLP.

## 2.5 Tratamento

### 2.5.1 Cirurgia e Quimioterapia

O tratamento da pitiose em animais e humanos apresenta dificuldades em função das características peculiares do *Pythium insidiosum*, sobretudo sua composição de parede celular e ausência de ergosterol na membrana citoplasmática, o que explica os resultados desanimadores com terapias antifúngicas, uma vez que o ergosterol constitui o componente alvo de ação da maioria dos fármacos antifúngicos (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989; FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Associado a esse fato, em muitos casos o sucesso das terapias também pode ser influenciado pelo tamanho e tempo da lesão, idade e estado nutricional do animal (MILLER, 1981). Três métodos terapêuticos são freqüentemente utilizados no tratamento da pitiose: cirurgia, quimioterapia e imunoterapia (MENDOZA *et al.*, 1996).

Segundo Miller (1981); Newton & Ross (1993); Chaffin *et al.* (1995); Mendoza *et al.* (1996) e Mendoza *et al.* (2003), a cirurgia é o método mais popular e mais freqüentemente utilizado no tratamento da pitiose eqüina, embora apresente altas taxas de recidiva. Para evitá-las, a intervenção cirúrgica requer a retirada de toda a região afetada, o que não é possível quando as lesões envolvem áreas anatômicas delicadas, assim como a região ventral do abdômen, membros e ossos (CHAFFIN *et al.*, 1995).

A terapia da pitiose eqüina utilizando fármacos antifúngicos como anfotericina B foi realizada por McMullan *et al.* (1977). Os autores obtiveram 50% de eficiência no tratamento, quando anfotericina B foi associado à remoção cirúrgica. No entanto, somente 30% dos animais responderam a terapia com anfotericina B isolada e 20% não

responderam aos tratamentos. Segundo Gonzáles *et al.* (1979) o tratamento das fomicoses subcutâneas é incrementado quando iodeto de potássio é usado após a extirpação cirúrgica da lesão. Resultados similares foram obtidos por Little & Kabay (1984); Chaffin *et al.* (1992) e Rodrigues & Luvizotto (2000) no tratamento de pitiose cutânea e Allison & Gillis (1990) em um caso de pitiose intestinal. Entretanto, Meireles *et al.* (1993) não obtiveram sucesso em dois eqüinos tratados com iodeto de potássio endovenoso, até mesmo quando associado à cirurgia. Utilizando alternativas de tratamento, Sedrish *et al.* (1997), obtiveram sucesso no uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio como terapia suplementar após a remoção cirúrgica de lesões de pitiose eqüina. Já Hubert & Grooters (2002), acreditam que o tratamento mais indicado para cura de pitiose clínica em eqüinos é a ressecção cirúrgica total do granuloma combinada com imunoterapia específica para *Pythium insidiosum*.

Na pitiose canina, nenhuma das terapias antifúngicas propostas apresentaram resultados satisfatórios. Entre os fármacos testados destacam-se a anfotericina, fluconazol, cetoconazol e itraconazol (ENGLISH & FROST, 1984; FOIL *et al.*, 1984; DYKSTRA *et al.*, 1999, JAEGER *et al.*, 2002; RIVIERRE *et al.*, 2005). Segundo alguns autores, a cirurgia continua como opção mais segura (HNILICA, 1998, THOMAS & LEWIS, 1998; GROOTERS, 2003). Entretanto, Grooters (2003) citam que as recidivas pós-operatórias são freqüentes. Por esta razão, indicam a terapia com itraconazol associado a terbinafina por dois a três meses após cirurgia. Este mesmo autor relata que aproximadamente 15% dos cães com pitiose gastrointestinal responderam ao tratamento com itraconazol ou anfotericina B lipídica. Também observou melhora ou cura clínica e sorológica em vários casos de pitiose cutânea canina e felina tratados com a associação antifúngica terbinafina/itraconazol. Afirma que embora, o número de animais que responderam a este protocolo de tratamento tenha sido baixo, a combinação antifúngica pareceu superior à terapia isolada.

O tratamento da pitiose felina também apresenta resultados variados. Bissonnette *et al.* (1991) ao realizar o tratamento de um felino com cetoconazol, observaram que houve melhora clínica, porém a lesão recidivou após o término do tratamento. Já Rakich *et al.* (2005) obtiveram resultados diferentes ao tratar dois felinos com pitiose gastrointestinal. O animal tratado com a associação terbinafina/itraconazol, durante dois meses após retirada cirúrgica da lesão, apresentou cura clínica sem recidivas. Porém, morreu subitamente quatro meses após a cirurgia. O outro felino, que recebeu terapia com itraconazol, também por dois meses após retirada cirúrgica da lesão, demonstrou

sorologia negativa, detectada por meio de um teste de ELISA, realizado cinco meses após tratamento. Este animal permaneceu em observação por nove meses, não apresentando recidiva da lesão durante esse período.

Os testes de sensibilidade *in vitro* com fármacos antifúngicos, realizados com *Pythium insidiosum*, são escassos e têm demonstrado resultados contraditórios entre si e, muitas vezes, com a terapêutica clínica. No estudo realizado por Sekhon *et al.* (1992) os poliênicos anfotericina B, hamycin e seus análogos não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azólicos fluconazol, cetoconazol e miconazol inibiram os isolados de *Pythium insidiosum* testados *in vitro*, com o miconazol apresentando os melhores resultados, seguido do cetoconazol. Entretanto, Triscott *et al.* (1993), constataram a boa resposta ao tratamento com anfotericina B na pitiose subcutânea periorbital em humanos, contrariando os resultados obtidos nos testes de sensibilidade. Em outro estudo, os fármacos anfotericina B, flucitosina, miconazol e griseofulvina não inibiram o crescimento do microrganismo, enquanto o itraconazol apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *Pythium insidiosum* testado (SHENEP *et al.*, 1998). De acordo com os autores, a associação de terbinafina e itraconazol apresentou efeito sinérgico e foi utilizada, com sucesso, no tratamento de um menino com infecção facial. Recentemente, Argenta *et al.* (2007a) investigaram a atividade *in vitro* do itraconazol e voriconazol combinado com terbinafina contra 30 isolados de *Pythium insidiosum* originários de casos clínicos de pitiose em animais no Brasil. Os resultados obtidos indicaram que a terbinafina foi ativa quando usada como fármaco único, enquanto itraconazol e voriconazol foram inativos. A associação antifúngica foi sinérgica em 17% dos isolados e indiferente em 83%. O tratamento de coelhos com pitiose experimental utilizando a associação antifúngica terbinafina e itraconazol não evidenciou resultados satisfatórios, salientando a ineficácia desta terapia na pitiose (ARGENTA *et al.*, 2007b).

### 2.5.2 Imunoterapia

A falta de escolhas terapêuticas encorajou o desenvolvimento e o uso de imunoterapia no tratamento da pitiose equina (MENDOZA *et al.*, 2003). As pesquisas iniciaram-se com Miller, em 1981, avançando de maneira significativa a partir de 1998 (SANTURIO *et al.*, 2006a). Mendoza & Newton (2005) afirmam que os dados clínicos da utilização da imunoterapia nos últimos 10 anos indicam que esta prática é segura, tanto em animais quanto em humanos, curando aproximadamente 60% dos indivíduos tratados

e modulando a resposta imune dos mesmos.

O imunoterápico desenvolvido por Miller (1981) foi composto por hifas inativadas e sonicadas de *Pythium insidiosum*. Embora o imunoterápico tenha apresentado alguns efeitos colaterais, como a forte reação no sítio de inoculação, curou 53% dos animais com doença clínica em 14 a 28 dias. Quando esta prática foi precedida de procedimento cirúrgico, observou-se incremento do índice de cura.

A partir do trabalho pioneiro de Miller (1981), vários pesquisadores iniciaram a utilização da imunoterapia em eqüinos, porém com modificações na técnica originalmente descrita. Em 1986, Mendoza & Alfaro utilizaram como antígeno apenas o sobrenadante das culturas de *Pythium insidiosum*, objetivando diminuir a reação no local de aplicação. Nesta ocasião, foram utilizados cinco animais para o teste, dos quais três foram recuperados. Em continuidade às pesquisas na Costa Rica, Mendoza *et al.* (1992b), desenvolveram dois protocolos de vacina, um utilizando massa celular como antígeno e o outro utilizando antígeno solúvel concentrado. O tratamento de 71 eqüinos com pitiose clínica apresentou resultados positivos naqueles animais com lesões com menos de dois meses de evolução, com 60% e 70% de eficiência, respectivamente. Comparando as formulações, os autores observaram que a formulação que utilizou antígeno solúvel concentrado apresentou menor reação no sítio de inoculação e estabilidade superior, podendo ficar armazenado por mais de 18 meses a 4°C. No Brasil, a utilização de um imunoterápico, denominado PitiumVac®, produzido a partir de hifas maceradas de culturas mistas de *Pythium insidiosum* e submetidas a liofilização, demonstrou índices de cura de 50% em eqüinos com lesões recidivantes, 60% em animais com lesões recentes e 83% em casos crônicos com mais de 1 ano de evolução clínica, característica que não havia sido observada com os outros imunoterápicos testados (MONTEIRO, 1999). Posteriormente, Santurio *et al.* (2003), utilizando coelhos como modelo experimental, avaliaram a eficiência de três processos de produção de imunoterápicos contra pitiose, produzidos a partir de cultivos e submetidos aos processos de maceração e sonicação. Observaram que o imunoterápico macerado liofilizado foi superior, reduzindo em até 72% a área dos nódulos cutâneos dos animais inoculados. Os resultados deste trabalho sugerem que a sonicação pode ocasionar a desnaturação dos antígenos protetores, reduzindo desta forma, a eficácia da imunoterapia. Simultaneamente, Mendoza *et al.* (2003), modificaram a formulação anteriormente descrita por Mendoza *et al.* (1992b) e a testaram em 18 eqüinos e seis caninos oriundos de diferentes áreas enzoóticas de pitiose

nos Estados Unidos. Este novo protocolo, contendo uma mistura de exoantígenos e antígenos citoplasmáticos, curou 72% dos eqüinos, incluindo casos crônicos e 33% dos caninos, sugerindo que a inclusão de antígenos citoplasmáticos aumenta as propriedades curativas do imunoterápico. Além disso, Leal *et al.* (2002), demonstraram que os imunoterápicos em uso podem ter sua atuação prolongada e potencializada quando utilizados com adjuvantes.

Resultados animadores da imunoterapia em humanos foram observados por Thitithanyanont *et al.* (1998). Após insucesso com tratamentos a base de drogas antifúngicas e cirurgia em um paciente com pitiose, o uso de imunoterápico induziu a cura após duas aplicações, com intervalo de 14 dias. Similarmente, Wanachiwanawin *et al.* (2004), utilizando o mesmo imunoterápico, observaram a cura de quatro pacientes (50%) com pitiose vascular. Baseados nos resultados desses relatos, Mendoza & Newton (2005) afirmam que a imunoterapia deve ser considerada como opção de tratamento em casos de pitiose humana. Recentemente, Krajaejun *et al.* (2006a), ao tratarem 12 pacientes com pitiose vascular com imunoterapia, obtiveram cura em cinco (41,6%), comprovando a eficácia do imunoterápico no tratamento da enfermidade em humanos.

A utilização do imunoterápico no tratamento da pitiose bovina também apresentou respostas positivas com eficácia de aproximadamente 100%. Em contrapartida aos resultados obtidos em eqüinos, bovinos e humanos, a imunoterapia em cães e gatos tem demonstrado resultados frustrantes (MENDOZA & NEWTON, 2005).

Apesar do progresso nos estudos sobre a doença e imunoterapia, é importante ressaltar que ainda não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção por *Pythium insidiosum* e as explicações para os mecanismos de infecção e de cura são baseados em hipóteses fundamentadas em observações da doença em humanos e eqüinos (SANTURIO *et al.*, 2006a).

Conforme Miller (1981), o caráter progressivo da doença em eqüinos imunocompetentes sugere a ocorrência de uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio na mesma que impede o sistema imunológico de responder à infecção. As hifas, mesmo sendo antigênicas, não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro, devido à marcante reação inflamatória, particularmente eosinofílica, que recobre a superfície das hifas, impedindo a exposição dos antígenos requeridos para a correta estimulação antigênica. Esse autor acredita que a vacinação supera os efeitos inibitórios pela introdução de fragmentos de hifas e de fatores citoplasmáticos, os quais são reconhecidos



como antígenos estranhos, induzindo desta forma, uma resposta imune humoral e celular, com preponderância da imunidade humoral, evidenciada pela presença de plasmócitos no infiltrado celular das lesões após imunoterapia. Nessa ocasião, o autor propôs que os anticorpos poderiam atuar por meio de dois diferentes mecanismos: um primeiro envolvendo citotoxicidade dependente de anticorpos (IgG) e mediado por células (linfócitos, macrófagos e talvez eosinófilos), e o segundo envolvendo imunoglobulina e o sistema complemento, onde os anticorpos específicos estimulados pelo imunoterápico ativariam o sistema complemento, danificando a parede celular e promovendo a lise do agente. A participação da resposta humoral foi também demonstrada por Newton & Ross (1993) ao verificarem que o nível de anticorpos anti-*Pythium* aumentavam em equinos doentes submetidos à imunoterapia. Entretanto, Mendoza *et al.* (1992b) já haviam demonstrado a importância da resposta celular na cura da pitiose ao observarem que os níveis de anticorpos em equinos tratados com imunoterápico não aumentavam após o tratamento e inclusive desapareciam após a cura, evidenciando a participação da imunidade celular. Posteriormente, resultados similares foram encontrados por Leal *et al.* (2005) ao avaliarem o perfil protéico do soro de equinos pré e pós-tratamento com imunoterápico utilizando western-blot. Alterações quantitativas e qualitativas no perfil de IgG não foram observadas, suportando o envolvimento da resposta celular no mecanismo de cura.

Embora Miller (1981) tenha explanado parcialmente os mecanismos envolvidos na doença e na cura por imunoterapia, a provável hipótese de cura foi consistentemente proposta por Mendoza *et al.* (1996). Posteriormente, Mendoza *et al.* (2003), avaliando as propriedades imunoterápicas de sua vacina, descreveram com maiores detalhes os prováveis mecanismos imunológicos envolvidos na cura. Segundo esses autores, a imunoterapia induz a liberação de antígenos citoplasmáticos que estimulam uma resposta mononuclear que resulta em cura. É provável que estes imunógenos sejam apresentados ao sistema imune de uma forma diferente que durante a infecção natural, induzindo a uma regulação negativa da subpopulação de linfócitos T auxiliares (Th2). Em contrapartida, estimulam uma outra subpopulação de células imunes, preferencialmente linfócitos Th1. Thitithanyanont *et al.* (1998), baseados nos eventos celulares antes e após imunoterapia em humanos e animais, já haviam sugerido que as propriedades curativas do imunoterápico poderiam ser devidas a uma imunomodulação da resposta imunológica. Esta hipótese foi baseada no fato que linfócitos Th2 produzem interleucina 4 e

interleucina 5, assim como, IgE, IgG e IgM, todos envolvidos na resposta de hipersensibilidade e eosinofilia. Contrariamente, a subpopulação Th1 produz interleucina 2 e INF- $\gamma$  (interferon-  $\gamma$ ), estando envolvida na expansão de linfócitos T citotóxicos, ativação de macrófagos e secreção de isótipos de IgG que ativam complemento. O desaparecimento da resposta eosinofílica e expressão de acentuada reação mononuclear após imunoterapia, observada por Miller (1981), Hensel *et al.* (2003) e Mendoza *et al.* (2003), associado aos altos títulos de interleucina 4, interleucina 5 e IgE observados em humanos com pitiose arterial e desaparecimento de seus níveis após imunoterapia, com concomitante aumento dos níveis de interleucina 2 (WANACHIWANAWIN *et al.*, 2004), fortemente suportam essa hipótese. Similarmente, Mendoza *et al.* (2003) também encontraram baixos títulos de IgE em eqüinos curados após imunoterapia. Além disso, estes mesmos autores demonstraram, em estudos histopatológicos antes e após terapia, que quando se utiliza o imunoterápico, as hifas são aparentemente destruídas pela população de mononucleares, sendo observadas como estruturas tubulares vazias, somente identificadas como hifas de *Pythium insidiosum* por imunofluorescência. Miller (1981) também observou a destruição de hifas em tecidos de eqüinos vacinados. Todas essas evidências parecem não deixar dúvidas de que o mecanismo de cura é decorrente, predominantemente, da resposta imune celular (MENDOZA & NEWTON, 2005).

Os imunoterápicos de corrente uso apresentam propriedades curativas, sendo aplicados em animais com doença clínica, uma vez que as propriedades profiláticas não têm sido completamente avaliadas. No entanto, Mendoza *et al.* (1992b) observaram que alguns eqüinos curados por imunoterapia sofriam re-infecção no ano seguinte, sugerindo que, se a ação profilática existe, é de curta duração. Mendoza *et al.* (2003) acreditam que a proteção a re-infecção pode ser devida a produção de anticorpos, principalmente IgG.

## **2.6 Acetato de caspofungina**

O crescente surgimento de micoses sistêmicas graves, associado aos problemas de toxicidade dos antifúngicos, assim como o aparecimento de resistência de alguns fungos aos fármacos antifúngicos, incrementou a busca por novos compostos, mais ativos, menos tóxicos, melhor tolerados e com novos sítios de ação (ROMERO *et al.*, 2005). Neste contexto, o desenvolvimento de inibidores da síntese de glucanas da parede celular fúngica representa um importante avanço na quimioterapia antifúngica. Os compostos

que apresentam esse mecanismo de ação incluem os ácidos terpenóides, as papulacandinas e as equinocandinas. Estas últimas são hexapeptídios cíclicos ligados a uma cadeia lateral lipofílica, sendo o acetato de caspofungina (L-743, 872, MK-0991) o primeiro fármaco deste grupo a estar disponível nos Estados Unidos e Europa, onde é comercializado com o nome de Cancidas® (Merck) e Caspofungina MSD® (Merck), respectivamente (DERESINSKI & STEVENS, 2003). Posterior a liberação do acetato de caspofungina em 2001, nos anos de 2005 e 2006, outras duas equinocandinas, micafungina e anidulafungina tornaram-se disponíveis para uso clínico (PETRIKKOS & SKIADA, 2007).

O acetato de caspofungina é um lipopeptídeo anfipático solúvel em água com uma massa molecular de 1213 KDa. Constitui-se num derivado semi-sintético da pneumocandina Bo, um produto natural da fermentação do fungo *Glarea lozoyensis* (DERESINSKI & STEVENS, 2003; KARTSONIS *et al.*, 2003; LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). O seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da síntese de  $\beta(1,3)$ -D-glucana da parede celular fúngica por inibição não competitiva da enzima  $\beta(1,3)$ -D-glucana sintase, a qual é indispensável para síntese da parede fúngica (DOUGLAS, 2001; DENNING, 2003; DERESINSKI & STEVENS, 2003; KARTSONIS *et al.*, 2003; LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003; MASCHMEYER & GLASMACHER, 2005; PETRIKKOS & SKIADA, 2007). Embora o mecanismo de ação das equinocandinas esteja bem caracterizado, Denning (2003) afirma que os trabalhos desenvolvidos com o intuito de identificar o local exato de ligação das equinocandinas no complexo enzimático glucana sintase, não conseguiram esclarecer completamente essa questão. As cadeias de  $\beta(1,3)$ -D-glucana formam uma sólida matriz tridimensional, constituindo-se no maior componente da parede fúngica, promovendo integridade estrutural e estabilidade osmótica na maioria dos fungos patogênicos (LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). Essas cadeias são sintetizadas pela ação do complexo enzimático glucana sintase que se encontra ligado a membrana citoplasmática. Como substrato utiliza UDP-glicose, a partir do qual sintetiza as cadeias poliméricas de  $\beta(1,3)$ -D-glucanas e as secreta para o espaço periplasmático, sendo posteriormente incorporadas na parede celular. Esse sistema de enzimas é codificado por genes *FKS*, já identificado e caracterizado em diferentes fungos (DOUGLAS, 2001; DENNING, 2003; DERESINSKI & STEVENS, 2003). Nos oomicetos, as enzimas responsáveis pela síntese dos polissacarídeos da parede, especialmente  $\beta(1,3)$ glucana e celulose sintases, assim como

genes similares ao *FKS* dos fungos, ainda não foram completamente identificados e caracterizados (BOUZENZANA *et al.*, 2006).

A inibição da síntese de  $\beta(1,3)$ -D-glucana produz um duplo efeito, fungistático e fungicida. O efeito fungistático resulta do bloqueio da síntese da parede celular, reduzindo assim o crescimento fúngico. Já o efeito fungicida, resulta de uma mudança na integridade da parede celular, a qual perde sua resistência mecânica tornando-se incapaz de resistir à pressão osmótica interna, cujo resultado é a destruição da célula fúngica (LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). Como esta enzima não existe nas células dos mamíferos, este modo de ação é único e específico na célula fúngica, eliminando-se assim, a toxicidade para os animais e humanos. Por este modo de ação também se explica a ausência de resistência cruzada com os demais antifúngicos (MASCHMEYER & GLASMACHER, 2005).

Estudos de farmacocinética têm demonstrado que o acetato de caspofungina não é absorvido por via oral, devendo ser administrado em infusão endovenosa. No plasma sanguíneo, encontra-se ligado a proteínas plasmáticas, principalmente albumina (96%). A distribuição, e não a excreção ou a biotransformação, constitui o mecanismo predominante que influencia as depurações plasmáticas, ocorrendo pouca excreção ou biotransformação nas primeiras 30 horas após a administração. A concentração plasmática declina de maneira trifásica, observando-se uma fase  $\alpha$  curta, com meia vida de 60 -90 minutos após a infusão, o que coincide com a distribuição do fármaco para os fluidos extracelulares. A seguir, constata-se a presença de uma fase  $\beta$  longa, que apresenta meia vida de 9-11 horas, que coincide com a depuração plasmática e conseqüente distribuição para os tecidos. Esta fase longa permite a utilização do acetato de caspofungina em doses únicas diárias. Uma fase  $\gamma$ , com meia vida de 40-50 horas, é somente observada após a administração de doses mais elevadas (KARTSONIS *et al.*, 2003).

Hadju *et al.* (1997), estudando a farmacocinética do acetato de caspofungina em camundongos, observaram que as concentrações do fármaco no fígado, baço e rins foram marcadamente mais altas que as concentrações plasmáticas e Groll *et al.* (2001), avaliando o comportamento do acetato de caspofungina em coelhos, constataram que o mesmo foi bem tolerado, atingindo concentrações plasmáticas que alcançaram ou excederam as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) consideradas ótimas para inibição dos microrganismos patogênicos, particularmente *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. Maschmeyer & Glasmacher (2005) baseados em estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem

que concentrações plasmáticas mínimas de 1µg/mL do fármaco são requeridas para que atividade antifúngica *in vivo* seja confiável e segura.

As equinocandinas são degradadas lentamente no fígado por hidrólise e N-acetilação, sendo o metabolismo do fármaco independente do sistema enzimático citocromo P-450. Não há formação de metabólitos ativos, e os metabólitos formados são excretados pelas fezes e urina, sendo mínima a excreção renal de droga ativa (apenas 1-2%) (MASCHMEYER & GLASMACHER, 2005).

Letscher-Bru & Herbrecht (2003) e Romero *et al.* (2005) afirmam que os testes de suscetibilidade *in vitro* realizados com acetato de caspofungina têm sido conduzidos utilizando o método de referência do CLSI. Entretanto, este método não está padronizado para as equinocandinas, não existindo determinação de CIMs nem correlação dos dados *in vitro* com eficácia clínica. Desta maneira, deve-se ter cautela no momento de extrapolar os resultados obtidos *in vitro* com a atividade *in vivo*.

Estudos de suscetibilidade indicam que o acetato de caspofungina apresenta atividade *in vitro* contra espécies de *Candida*, incluindo amostras resistentes a anfotericina B e fluconazol, *Aspergillus* spp. e outros fungos clinicamente importantes como *Acremonium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Paecilomyces variotii*, *Scedosporium apiospermum* e fungos dimórficos (DEL POETA *et al.*, 1997; ESPINEL-INGROFF, 1998; PFALLER *et al.*, 1998; KOHLER *et al.*, 2000). Entretanto, apresenta pouca atividade contra *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporum* spp. (BARTIZAL *et al.*, 1997; ESPINEL-INGROFF, 1998), zigomicetos (PFALLER *et al.*, 1998; DEL POETA *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2005), *Fusarium* spp. (DEL POETA *et al.*, 1997; PFALLER *et al.*, 1998; ARIKAN *et al.*, 2001) e *Sporotrix schenckii* (ESPINEL-INGROFF, 1998). Atividade fungicida tem sido observada em *Candida* spp., enquanto que estudos *in vitro* têm demonstrado efeito fungistático em *Aspergillus* spp. (LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). Em estudos experimentais em animais esta pneumocandina tem demonstrado atividade antifúngica no tratamento de candidíase e aspergilose disseminada (ABRUZZO *et al.*, 1997; PETRAITIENE *et al.*, 2002), histoplasmose (GRAYBILL *et al.*, 1998), coccidiodomicose (GONZÁLEZ *et al.*, 2001) e infecções por *Pneumocystis carinii* (POWLES *et al.*, 1998). Em humanos, tem sido demonstrada eficácia clínica contra infecções causadas por *Candida* e *Aspergillus*, estando o acetato de caspofungina licenciado pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de aspergilose invasiva em pacientes que são refratários ou intolerantes a outras terapias, candidemias ou

outras infecções causadas por *Candida* (KARTSONIS *et al.*, 2003; PETRIKKOS & SKIADA, 2007).

Grooters (2003) acredita que as equinocandinas possam ser eficazes contra o *Pythium insidiosum*, pois este como os demais oomicetos, apresenta grande quantidade de  $\beta$ -glucanas na parede celular.

### **2.7 Norma M38-A: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos: Norma Aprovada do NCCLS**

As mudanças expressivas na epidemiologia das micoses humanas que ocorreram nas últimas décadas, notadamente o aumento na incidência de micoses sistêmicas e alteração no espectro de microrganismos causadores dessas micoses, assim como, os relatos de resistência dos fungos aos fármacos disponíveis comercialmente e o número crescente de agentes antifúngicos, despertaram o interesse das comunidades médica e científica pela padronização de testes de suscetibilidade. Preocupada com esses fatos, no ano de 1982, a entidade responsável pela normalização de técnicas de laboratório clínico nos Estados Unidos, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS; atualmente renomeado para *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI*), designou um subcomitê para padronizar testes de suscetibilidade de fungos a drogas antimicóticas (COLOMBO & ALVES, 2004). Com esse objetivo, vários estudos foram realizados para definir as condições ideais de realização dos ensaios, incluindo a definição do método e preparação do inóculo, composição e pH do meio, temperatura e tempo de incubação e determinação dos critérios de leitura do teste (PFALLER *et al.* 1988; PFALLER *et al.*, 1990; ESPINEL-INGROFF & KERKERING, 1991; FROMTLING *et al.*, 1993; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1997; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2002). A partir destes estudos, primeiramente foi padronizado o método da macrodiluição em caldo para leveduras (M27-A). Dada a maior complexidade morfológica dos fungos filamentosos, bem como a mais lenta curva de crescimento de vários representantes desses gêneros, as padronizações de testes de sensibilidade com tais microrganismos apresentaram dificuldades adicionais em relação às leveduras (COLOMBO & ALVES, 2004). Porém, com a crescente ocorrência de micoses emergentes causadas por fungos filamentosos, em agosto de 2002, foi aprovada a Norma M38-A - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos: Norma

aprovada do NCCLS. Constitui-se numa norma de referência desenvolvida mediante processo consensual que descreve e padroniza os métodos para testar a sensibilidade dos fungos filamentosos que causam infecções fúngicas invasivas, incluindo espécies de *Aspergillus*, espécies de *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* e *Sporotrix schenckii*, assim como outros fungos patogênicos oportunistas, aos agentes antifúngicos (NCCLS- 2002).

## CAPÍTULO 1

### ZOOSPOROGÊNESE *IN VITRO* ENTRE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum*



**ARTIGO 1**

***Zoosporogênese in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum***

Artigo publicado na Revista Ciência Rural

## Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*

*In vitro* zoosporogenesis among oomycetes *Pythium insidiosum* isolates

Daniela Isabel Brayer Pereira<sup>1\*</sup> Janio Morais Santurio<sup>II</sup> Sydney Hartz Alves<sup>II</sup>  
Juliana Siqueira Argenta<sup>I</sup> Ayrton Sydnei Cavalleiro<sup>II</sup> Laerte Ferreira<sup>III</sup>

### RESUMO

*Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático, responsável pela etiologia da pitiose, uma enfermidade crônica, observada frequentemente em eqüinos. A produção de zoósporos móveis por este microrganismo se constitui no fator determinante da ocorrência da enfermidade. Este estudo avaliou a zoosporogênese e quantificou a produção de zoósporos de 32 amostras de *Pythium insidiosum* isoladas de eqüinos naturalmente infectados. *Pythium insidiosum* foi cultivado em meio Corn Meal Agar acrescido de fragmentos de grama, durante 5 dias, a 37°C. Posteriormente, os fragmentos de grama parasitados foram incubados em Meio de Indução a 37°C, por 24 horas. Observou-se que 16 amostras (50%) produziram 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>, 12 isolados (37,5%) produziram acima de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>, enquanto quatro amostras (12,5%) produziram menos de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>. O período de maior produção de zoósporos foi entre 6 e 8 horas de incubação. O protocolo utilizado na indução da zoosporogênese mostrou-se eficiente e representa uma importante ferramenta, tanto para a identificação do *Pythium insidiosum*, como para a obtenção de zoósporos em quantidades suficientes para a inoculação em animais experimentais e aplicação no desenvolvimento de testes de suscetibilidade.

**Palavras-chave:** *Pythium insidiosum*, zoosporogênese, zoósporos, oomiceto, pitiose.

### ABSTRACT

*Pythium insidiosum* is an aquatic oomycete and the etiology of a chronic disease called pythiosis, commonly found in the skin of horses. The production of mobile zoospores by this microorganism is the determinant factor of this disease. This study evaluated the zoosporogenesis and quantification of zoospores in 32 samples of *Pythium insidiosum* isolated from

horses with pythiosis. The assay used culture of the *Pythium insidiosum* in Corn Meal Agar plus grass blades for 5 days at 37°C. The grass blades were incubated in Induction Medium at 37°C for 24 hours. The findings showed 16 samples (50%) yielded 20,000 zoospores mL<sup>-1</sup>, 12 (37.5%) samples yielded over 20,000 zoospores mL<sup>-1</sup> and 4 samples (12.5%) yielded less than 20,000 zoospores mL<sup>-1</sup>. The zoospores production was higher between 6 and 8 hours of incubation. The protocol used in the zoosporogenesis induction was efficient and represents an important tool for *Pythium insidiosum* identification and the attainment of zoospores in adequate amounts for inoculation in experimental animals and application in the development of susceptibility tests.

**Key words:** *Pythium insidiosum*, zoosporogenesis, zoospores, oomycete, pythiosis.

### INTRODUÇÃO

*Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático, classificado no Reino *Stramenopila*, Phylum *Oomycota*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* e Espécie *insidiosum*. Esse gênero apresenta mais de 200 espécies, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas (ALEXOPOULOS et al., 1996). Apenas *Pythium insidiosum* é patogênico para mamíferos, uma vez que causa pitiose, uma doença crônica, piogranulomatosa, que acomete animais e humanos (De COCK et al., 1987).

A pitiose é mais freqüente na espécie eqüina, manifestando-se principalmente nas formas

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. \*Endereço para correspondência: Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 20, sala 4139, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Fone-fax: (055) 32208906. E-mail: danielabrayer@yahoo.com.br.

<sup>II</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>III</sup> Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

clínicas cutânea e subcutânea. Nestes animais, observa-se o desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, de crescimento rápido e difícil tratamento, localizadas, predominantemente, nas extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal. A presença de massas necróticas semelhantes a corais, denominadas *kunkers*, é característica da enfermidade nos equinos (MILLER & CAMPBELL, 1982; MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELLES et al., 1993; MENDOZA et al., 1993). Já, nas demais espécies, os *kunkers* não são observados e a doença se manifesta, principalmente, nas formas cutânea e gastrointestinal em caninos e felinos (GROOTERS, 2003; RAKICH et al., 2005), e subcutânea em bovinos e ovinos (SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; TABOSA et al., 2004). Nos últimos anos, é crescente o número de 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). Em humanos, é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum na Tailândia (IMWIDITHAYA, 1994; KRAJAEJUN et al., 2006). Porém, casos de pitiose humana também têm sido descritos em outros países, inclusive no Brasil (PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; BOSCO et al., 2005).

Segundo MILLER (1983), a presença de áreas alagadas, vegetação abundante e temperatura ambiental superior a 15 - 20°C constituem as condições ideais para o desenvolvimento de *Pythium insidiosum*. Nessas situações, há a produção de zoósporos móveis, biflagelados, responsáveis pela infecção em mamíferos. Acredita-se que os zoósporos livres nas águas sejam atraídos para a pele dos animais, onde se encistam, iniciando a infecção cutânea. A enfermidade ocorre em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, tendo sido relatada em países como Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua-Nova Guiné, Tailândia, Venezuela e África (MENDOZA et al., 1996; PÉREZ et al., 2005; RIVIERRE et al., 2005). Embora não exista um levantamento preciso da prevalência da enfermidade no Brasil, a pitiose representa um problema à equinocultura, especialmente em regiões alagadiças como o Pantanal Matogrossense (LEAL et al., 2001).

O diagnóstico presuntivo de pitiose é realizado levando-se em consideração a epidemiologia, sinais clínicos e aspectos macro e microscópicos das lesões. O isolamento e identificação do agente são de grande valor para o diagnóstico definitivo e diferencial, embora, atualmente, métodos sorológicos e moleculares constituam poderosas ferramentas para o diagnóstico precoce e preciso de pitiose (SANTURIO et al., 2006).

ALEXOPOULOS et al. (1996) e MOORE-LANDECKER (1996) afirmam que, para realizar-se a correta identificação do *Pythium insidiosum*, é necessário observar-se as características morfológicas dos zoosporângios, zoósporos, oogônia e anterídio. Para isto, é preciso a obtenção de zoósporos em laboratório, utilizando-se a técnica de zoosporogênese em meio líquido descrita por MENDOZA & PRENDAS (1988). A obtenção das estruturas infectantes é importante para o desenvolvimento de estudos *in vitro* de suscetibilidade a drogas e reprodução experimental da enfermidade em coelhos, somente possível pela inoculação subcutânea de água rica em zoósporos produzidos *in vitro* (MILLER & CAMPBELL, 1983; SANTURIO et al., 2003). Sendo assim, a utilização de protocolos de indução da zoosporogênese em *Pythium insidiosum* é ponto crucial nos estudos que envolvem este oomiceto. Apenas MENDOZA & PRENDAS (1988), CHAIPRASERT et al. (1990) e SANTURIO et al. (2003) relataram detalhadamente a metodologia de indução de zoosporogênese.

O protocolo de indução da zoosporogênese em *Pythium insidiosum* utilizado no presente trabalho foi baseado na técnica descrita por MENDONZA & PRENDAS (1988) e teve por objetivos induzir a zoosporogênese de 32 isolados de *Pythium insidiosum* e avaliar a produção de zoósporos, com o intuito de utilizá-los na reprodução experimental da enfermidade e no desenvolvimento de testes de suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 32 amostras de *Pythium insidiosum*, isoladas de equinos naturalmente infectados, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul e do Mato Grosso do Sul (Pantanal) e duas amostras padrão ATCC 58637 e CBS 101555, mantidas na coleção de microrganismos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

As amostras de *Pythium insidiosum* previamente cultivadas em *Corn Meal Agar* (CMA) foram repicadas para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultivo, juntamente com fragmentos de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos. As placas foram incubadas por um período de 5 dias à temperatura de 37°C. Após esse período de cultivo, os fragmentos de grama parasitados pelo *Pythium insidiosum* foram transferidos para uma placa de Petri contendo 30mL de Meio de Indução, composto pela solução A:  $K_2HPO_4$  (1,0 M),  $KH_2PO_4$  (1,0 M),  $(NH_4)_2HPO_4$  (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 era obtido pela mistura de 0,5mL da solução A e 0,1mL da solução B em 1.000mL de água destilada estéril. As placas de Petri contendo o Meio de Indução juntamente com a grama infectada eram 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. Nas primeiras 12 horas de incubação, as avaliações foram feitas em intervalos de 1 hora e a partir da 12ª hora em intervalos de 6 horas. Após observação da formação de zoosporângios e liberação dos zoósporos, realizou-se a contagem de zoósporos livres no Meio de Indução, utilizando-se hemocitômetro de Neubauer (SANTURIO et al., 2003).

## RESULTADOS

Nas primeiras três horas de incubação no Meio de Indução, observou-se um entumescimento na extremidade de algumas hifas. A partir dessa observação, podia-se acompanhar o processo de formação dos zoosporângios, verificando-se que o pequeno entumescimento na extremidade da hifa aumentava progressivamente, até assumir a forma de uma pequena vesícula. Durante este processo era possível a nítida visualização de fluxo citoplasmático dirigindo-se do interior da hifa para a vesícula. Após o completo preenchimento da vesícula, iniciava-se um processo de diferenciação no seu interior que culminava com a formação dos zoósporos. Estes se caracterizavam pelos movimentos rápidos de seus flagelos, o que resultava na ruptura da membrana do zoosporângio com liberação dos zoósporos no Meio de Indução. Os zoósporos liberados apresentavam forma ovóide, evidenciando a presença de dois flagelos. Uma vez livres no Meio de Indução, nadavam em diferentes direções por meio de movimentos de rotação em torno de seu próprio eixo, permanecendo ativos por aproximadamente 15 minutos. Antes de sofrer o encistamento, nadavam lentamente até a parada completa de movimentos, tornando-se, então, globosos. Após alguns minutos, os zoósporos encistados emitiam tubos germinativos que formavam longos filamentos após 24 horas de incubação a 37°C. Todo o processo da zoosporogênese, desde a diferenciação da hifa até a liberação dos zoósporos, requeria, aproximadamente, 35 a 40 minutos.

Embora zoósporos tenham sido observados já nas primeiras 3 horas de indução, constatou-se que o maior número foi produzido entre 6 e 8 horas de incubação. A partir de 9 horas de incubação, a quantidade de zoósporos diminuía gradativamente até

a 24ª hora, observando-se apenas zoósporos encistados emitindo tubos germinativos, mas sem a formação de novos zoosporângios.

Das 32 amostras de *Pythium insidiosum* estudadas, observou-se que 16 isolados (50%) produziram 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>, 12 isolados (37,5%) produziram acima de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup> (variando de 22.500 a 107.500 zoósporos mL<sup>-1</sup>), enquanto que quatro amostras (12,5%) produziram menos de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup> (5.000 a 10.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>). Observou-se, também, que os isolados de *Pythium insidiosum* de obtenção mais recente apresentaram elevado número de zoósporos.

## DISCUSSÃO

Todos os isolados de *Pythium insidiosum* avaliados apresentaram a habilidade de gerar zoósporos, demonstrando que o protocolo utilizado é eficiente para a identificação do microrganismo. Desta forma, pode-se inferir que o presente protocolo também pode ser utilizado para obtenção de zoósporos em número suficiente para reprodução da enfermidade em animais experimentais e realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos. SANTURIO et al. (2003) reproduziram experimentalmente a doença em coelhos utilizando 17.500 zoósporos viáveis mL<sup>-1</sup>. Já para a obtenção de inóculo de *Pythium insidiosum* para uso em testes de suscetibilidade *in vitro*, estudos em andamento estimam que o número ideal de zoósporos situa-se entre 20.000 e 30.000 mL<sup>-1</sup> (ALVES, 2006 – informe pessoal).

MENDOZA & PRENDAS (1988) citam que o protocolo para indução de zoosporogênese deve ser baseado em alguns aspectos como: parasitismo de fragmentos de grama em um meio pobre em nutrientes, seguido da incubação em um Meio de Indução contendo ions Ca<sup>2+</sup> (cálcio), Mg<sup>2+</sup> (magnésio) e K<sup>+</sup> (potássio) com temperatura e pH adequados. A importância desses ions na zoosporogênese foi relatada por SHIPTON (1987) ao demonstrar que tanto a liberação dos zoósporos quanto a sua motilidade foi influenciada pelas concentrações de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> no Meio de Indução. Segundo SHIPTON (1985) e MENDOZA & PRENDAS (1988), a quantidade de zoósporos produzidos, assim como os tempos de incubação são dependentes do meio utilizado para crescimento do *Pythium insidiosum* antes do processo de indução, da zoosporogênese. Em um estudo realizado com nove isolados de *Pythium insidiosum*, observou-se que o número máximo de zoosporângios e zoósporos foram obtidos após uma hora e meia de incubação em Meio de Indução a 37°C, quando utilizou-se o cultivo prévio com grama em ágar água a 2%, por

24 horas, a 37°C. Já quando o cultivo em fragmentos de grama foi realizado em outros meios como Sabouraud dextrose agar (SDA) e CMA, o tempo de incubação foi de quatro dias a 37°C e o período de maior produção de zoosporângios e zoósporos no Meio de Indução ocorreu após 5 horas e meia de incubação a 37°C (MENDOZA & PRENDAS, 1988). No presente trabalho, foi utilizado o meio de CMA para o cultivo de *Pythium insidiosum* em fragmentos de grama, pois a maioria dos isolados testados não apresentaram crescimento em ágar água a 2%. No CMA, observou-se ótimo crescimento no quinto dia de incubação a 37°C. Quando realizada a indução da zoosporogênese, observou-se que o número máximo de zoósporos foram obtidos entre 6 e 8 horas de incubação a 37°C, sendo estes resultados similares aos anteriormente relatados. Embora SHIPTON (1985) afirme que a presença de hifas jovens é o fator determinante para a abundante formação dos zoósporos e que o período prévio de crescimento considerado ótimo para a produção de zoósporos encontra-se entre 24 e 30 horas de incubação, observou-se, nas condições do presente estudo, ausência de crescimento do *Pythium insidiosum* no referido período. Este fato pode ser devido à idade das amostras utilizadas, pois a maioria delas havia sido isolada há alguns anos e vinham sendo repicadas, repetidamente, para manutenção, necessitando assim de um meio mais rico em nutrientes, o que justifica a ausência de crescimento no ágar água a 2% e o maior tempo de incubação para o crescimento. Os resultados obtidos permitem constatar que a utilização do meio de CMA é eficiente para a indução da zoosporogênese do *Pythium insidiosum*, mesmo que os períodos de incubação pré e durante indução sejam maiores aos períodos observados quando utilizado ágar água, como reportado nos estudos de MENDOZA & PRENDAS (1988). Além disso, por meio da metodologia da zoosporogênese, pode-se avaliar a morfologia de zoosporângios e zoósporos, constatando-se que todos os isolados estudados neste ensaio apresentaram características morfológicas condizentes com *Pythium insidiosum*, similares às descritas por SHIPTON et al. (1982), De COCK et al. (1987); CHAIPRASERT et al. (1990) e MENDOZA et al. (1996).

## CONCLUSÕES

O protocolo utilizado na indução da zoosporogênese mostrou-se eficiente e representa uma importante ferramenta, tanto para a identificação morfológica do *Pythium insidiosum*, como para a obtenção de zoósporos em quantidades suficientes para a inoculação em animais experimentais e desenvolvimento de testes de suscetibilidade.

## AGRADECIMENTOS E APRESENTAÇÃO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro durante a execução do trabalho e pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor.

Este trabalho é parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, vinculado ao Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## INFORME VERBAL

ALVES, S.H. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. E-mail: hartzsa@ccs.ufsm.br.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J. et al. Phylum Oomycota. In: *Introductory mycology*. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. Chap.23, p.683-737.
- BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, n.5, p.715-718, 2005.
- BUERGELT, C. et al. Abdominal pythiosis in a bengal tiger. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.37, n.2, p.186-189, 2006.
- CAMUS, A.C. et al. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.16, p.567-571, 2004.
- CHAIPRASERT, A. et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. *Mycoses*, v.33, n.6, p.317-323, 1990.
- DE COCK, A.W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.25, n.2, p.344-349, 1987.
- GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.33, p.695-720, 2003.
- IMWIDITHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. *Postgraduate Medical Journal*, v.70, p.558-560, 1994.
- KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human Pythiosis in Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, p.569-576, 2006.
- LEAL, A.T. et al. Pitiose - Revisão bibliográfica. *Ciência Rural*, v.31, n.4, p.735-743, 2001.
- MEIRELES, M.C.A. 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. et al. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.11, p.2967-2973, 1993.
- MENDOZA, L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Medicale*, v.6, n.4, p.151-164, 1996.
- 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, p.23-28, 1983.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Experimental pythiosis in rabbits. *Sabouraudia*, v.21, p.331-341, 1983.
- MOORE-LANDECKER, J. Zoosporic fungi. In: \_\_\_\_\_. *Fundamentals of the fungi*. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Chap.3, p.33-79.
- PEREZ, R.C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. *Veterinary Microbiology*, v.109, n.1-2, p.121-128, 2005.
- PRASERTWITAYAKU, N. et al. Human pythiosis, a rare cause of arthritis: case report and literature review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.33, n.3, p.204-214, 2003.
- RAKICH, P.M. et al. Pythiosis in two cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.17, p.262-269, 2005.
- RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. *Emerging Infectious Disease*, v.11, n.3, p.479-481, 2005.
- 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, n.1, p.1-14, 2006.
- SHIPTON, W.A. et al. Cell wall, zoospore and morphological characteristics of Australian isolates of a *Pythium* causing equine phycomycosis. *Transactions of the British Mycological Society*, v.79, n.1, p.15-23, 1982.
- SHIPTON, W.A. Zoospore induction and release in a *Pythium* causing equine phycomycosis. *Transactions of the British Mycological Society*, v.84, n.1, p.147-155, 1985.
- SHIPTON, W.A. Regulation by Ions of Zoospore release in *Pythium*. *Australian Journal of Botany*, v.35, n.1, p.79-89, 1987.
- TABOSA, I.M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. *Veterinary Pathology*, v.41, p.412-415, 2004.
- WELLEHAN, J.F. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.35, n.4, p.564-568, 2004.

## CAPÍTULO 2

### SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Pythium insidiosum* À CASPOFUNGINA

**ARTIGO 2**

**Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum*  
strains isolated from animals**

**Artigo publicado no Journal of Antimicrobial Chemotherapy**



## Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals

Daniela Isabel Brayer Pereira<sup>1</sup>, Janio Morais Santurio<sup>1\*</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>1</sup>, Juliana Siqueira Argenta<sup>1</sup>, Luciana Pötter<sup>2</sup>, Andréia Spanemberg<sup>3</sup> and Laerte Ferreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Prédio 20, 4139, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; <sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 11 May 2007; returned 5 July 2007; revised 3 August 2007; accepted 6 August 2007

**Objectives:** The present study evaluated the susceptibility of 27 clinical isolates of *Pythium insidiosum* to caspofungin *in vitro* and correlated the results with the therapeutic response *in vivo* in rabbits with experimental pythiosis.

**Methods:** The macrodilution method was performed in accordance with the CLSI document M38-A technique. Three reading criteria for MICs were adopted: MIC<sub>0</sub>, MIC<sub>1</sub> and MIC<sub>2</sub> (100%, 90% and 50% growth inhibition, respectively). The minimum fungicidal concentration was also determined. Ten rabbits inoculated with viable *P. insidiosum* zoospores were divided into two groups: group 1 (control) and group 2 (treated with caspofungin at a dosage of 1 mg/kg/day for 20 consecutive days).

**Results:** Of the isolates 51.8% had an MIC<sub>0</sub> of 64 mg/L, 88.8% of isolates had an MIC<sub>1</sub> between 8 and 64 mg/L and 62.9% of isolates had a minimum fungicidal concentration of 64 mg/L. In the *in vivo* assay, growth of subcutaneous lesions reduced during treatment, but rapidly resumed when treatment was stopped.

**Conclusions:** The results showed that caspofungin has limited fungistatic activity against *P. insidiosum*. This work is the first study to analyse the susceptibility of this oomycete to inhibitors of  $\beta$ -glucans of the cellular wall.

**Keywords:** pythiosis, oomycete, susceptibility

### Introduction

*Pythium insidiosum* is an aquatic oomycete, classified in the Kingdom *Stramenopila*. The genus *Pythium* comprises more than 200 species, and the majority of them are soil saprobes and plant pathogens. Only *P. insidiosum* is pathogenic to mammals. It causes pythiosis, a chronic pyogranulomatous disease that affects mainly horses, but can also affect dogs, cats, cattle, sheep and humans that inhabit tropical and subtropical regions.<sup>1</sup>

The composition of the cell wall and the lack of ergosterol in the cytoplasmic membrane of oomycetes explain the difficulties of antifungal therapy against pythiosis, since ergosterol is the target of action for the majority of the antifungal drugs available.<sup>1,2</sup> Various attempts to treat animals as well as humans with

antifungal drugs have presented variable and sometimes contradictory results as compared with results of *in vitro* assays.<sup>1</sup> Nevertheless, Shenep *et al.*<sup>3</sup> affirm that a pharmacological cure for pythiosis is possible; however, it must be guided by tests of *in vitro* susceptibility.

Caspofungin (L-743, 872, MK-0991) is a semi-synthetic derivative of the pneumocandin B<sub>0</sub>, whose mechanism of action consists of blocking the synthesis of  $\beta(1,3)$ -D-glucan of the fungal cell wall through the non-competitive inhibition of the enzyme  $\beta(1,3)$ -D-glucan synthase.<sup>4</sup> It is believed that this drug can be efficient against *P. insidiosum*, since this oomycete contains a great amount of  $\beta$ -glucan in the cell wall.<sup>2</sup>

The present study aimed at evaluating the *in vitro* susceptibility of *P. insidiosum* to caspofungin using the CLSI

\*Corresponding author. Tel/Fax: +55-55-32208906; E-mail: santurio@smail.ufsm.br

### Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against *P. insidiosum* strains

(formerly NCCLS) technique of macrodilution in broth as well as relating the results obtained *in vitro* with the response of *in vivo* therapy in rabbits with experimental pythiosis.

#### Materials and methods

##### Culture of *P. insidiosum*

Twenty-six samples of *P. insidiosum* isolated from pythiosis lesions from animals in Brazil (24 horses, 1 dog and 1 sheep) and one ATCC isolate (58637) were utilized.

##### Inoculum preparation for the antifungal susceptibility test

Each inoculum consisted of *P. insidiosum* zoospores obtained according to a previously described zoosporogenesis technique.<sup>5</sup>

##### Antifungal agent

Caspofungin (Cancidas<sup>®</sup>; MSD SHARP & DOHME GmbH, Haar, Germany) in the form of 50 mg was commercially acquired. It was dissolved in sterile distilled water and serially diluted in assay medium to yield final concentrations of 0.25–128 mg/L.

##### *In vitro* susceptibility test

The tests were performed using the macrodilution method in broth following the CLSI M38-A protocol.<sup>6</sup> After zoosporogenesis, the zoospores were counted using a Neubauer chamber. The induction medium containing the zoospores was diluted 1:10 in RPMI 1640 broth with L-glutamine, glucose and buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS (assay medium), yielding an inoculum with a final concentration of  $2-3 \times 10^3$  zoospores/mL. All the assays were performed in duplicate. The MICs were read after 24 h of incubation at 37°C. The reading was visual and assessed the growth or absence of growth of hyphae. Three MIC reading criteria were adopted: MIC0, MIC1 and MIC2 (growth inhibition of 100%, 90% and 50%, respectively). The concentration above MIC0 was utilized to determine the minimum fungicidal concentration.

##### Animals

Ten 3-month-old New Zealand rabbits, including males and females, were divided into two groups of five animals. All the animals were inoculated with *P. insidiosum* zoospores (isolate with MIC of 64 mg/L) by the subcutaneous route according to the methodology described by Santurio *et al.*<sup>5</sup> Group 1 (control) did not

receive treatment. Animals in group 2 were treated with 1 mg/kg/day caspofungin by the intraperitoneal route for 20 days, with treatment commencing on the 25th day after inoculation. Inoculated rabbits were checked every 3 days by measuring the subcutaneous nodular area (cm<sup>2</sup>) using a sliding calliper. The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria.

##### Statistical analysis

The areas of the lesions (cm<sup>2</sup>) were transformed into percentage and submitted to analysis of variance and *F*-test using a significance level of 5%. The Tukey test was carried out when differences between the treatments were detected. Regression analysis of the dates of the measurements was also performed, with adjustments in the polynomial model made up to the third order.

#### Results

The *in vitro* susceptibility of 27 isolates of *P. insidiosum* against caspofungin is listed in Table 1. The results indicated that 51.8% of the isolates had an MIC0 of 64 mg/L. Readings using MIC1 showed that 88.8% of the isolates required MICs that varied from  $\geq 8$  to 64 mg/L. The partial readings of 50% inhibition (MIC2) demonstrated that 55.5% of the isolates had MICs between 2 and 4 mg/L, and 44.4% had MICs between 8 and 16 mg/L. The minimum fungicidal concentration was 64 mg/L for 62.9% of the samples.

The animals developed subcutaneous nodules 25 days after the inoculation of the zoospores. The subcutaneous lesion areas exhibited a reduction in their progression during the treatment with caspofungin. However, lesions resumed growth after the end of the treatment, even though they were smaller ( $P = 0.0004$ ) than the lesions in the control group (Figure 1). One animal of the treated group died on the 23rd day after the end of the treatment and had pythiosis lesions in the lungs and kidneys.

#### Discussion

Susceptibility studies on *P. insidiosum* are rare and there is no standardized technique for *in vitro* tests for this oomycete. Only Shenep *et al.*<sup>3</sup> and Sekhon *et al.*<sup>7</sup> have performed tests *in vitro* with *P. insidiosum* to evaluate its susceptibility to amphotericin B, 5-fluorocytosine, terbinafine and azoles without, however,

Table 1. Distribution of caspofungin MICs for 27 *P. insidiosum* isolates using three reading criteria

Reading criteria	No. of isolates (%) with the indicated MIC (mg/L)								MIC range (mg/L)	GM MIC (mg/L)
	2	4	8	16	32	64	128			
MIC0	0	0	3 (11.1)	3 (11.1)	7 (25.9)	14 (51.8)	0		8–64	36.38
MIC1	0	3 (11.1)	9 (33.3)	7 (25.9)	8 (29.6)	0	0		4–32	13.36
MIC2	6 (22.2)	9 (33.3)	6 (22.2)	6 (22.2)	0	0	0		2–16	5.44
MFC	0	0	2 (7.4)	3 (11.1)	1 (3.7)	17 (62.9)	4 (14.8)		8–128	50.79

MIC0, 100% growth inhibition; MIC1, 90% growth inhibition; MIC2, 50% growth inhibition; MFC, minimum fungicidal concentration; GM, geometric mean.

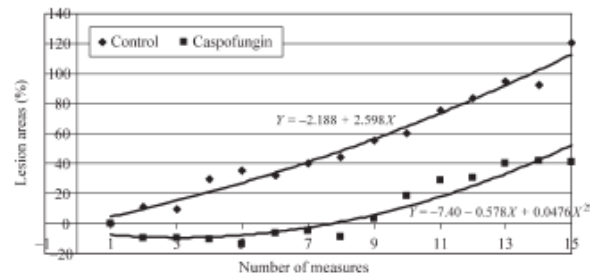
Pereira *et al.*

Figure 1. Percentage variation of the subcutaneous lesion areas in rabbits experimentally inoculated with *P. insidiosum* zoospores and treated with the antifungal caspofungin.

following a standard methodology. The present study employed the parameters recommended by the document M38-A to test the susceptibility of *P. insidiosum* isolates to caspofungin.

The standardized inoculum obtained by counting zoospores led to reproducible results *in vitro*. In our opinion, this procedure provides the most reliable methodology for susceptibility tests with this oomycete. Adjustment of the inoculum through the spectrophotometric procedure cannot be applied to the zoospore suspensions because it does not produce turbidity in the medium and Espinel-Ingroff *et al.*<sup>8</sup> emphasize that the preparation of the inoculum with a suspension of hyphae is not reliable. However, other authors have utilized spectrophotometrically adjusted suspensions of *P. insidiosum* hyphae as inocula.<sup>7</sup>

The lack of a clear standard to estimate caspofungin MIC, in addition to the absence of data concerning standardization of *in vitro* tests for *P. insidiosum*, justifies the employment of MIC readings considering the three criteria. Likewise, other *in vitro* assays with filamentous fungi that evaluated susceptibility to caspofungin also utilized different reading criteria for the MICs.<sup>9,10</sup> The detection of morphological alterations in the hyphae, defined as minimum effective concentration (MEC), may constitute a more appropriate method for evaluating the susceptibility to echinocandins compared with the conventional MIC.<sup>10</sup> Nevertheless, it was not possible to determine the MEC for *P. insidiosum* isolates in the present work because morphological alterations were not detected on hyphae.

The high MICs and lack of fungicidal activity seen in this study suggest that *P. insidiosum* is poorly susceptible to caspofungin. Studies demonstrate that caspofungin displays *in vitro* activity against species of *Candida* and *Aspergillus* spp. with MICs and MECs of 1 mg/L. However, it shows little activity against *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp., zygomycetes and *Fusarium* spp., generally with MICs just above 16 mg/L.<sup>4</sup>

The low susceptibility of *P. insidiosum* to caspofungin was also established by the *in vivo* assay. The results indicated that caspofungin activity against *P. insidiosum* was only fungistatic. Further studies using doses >1 mg/kg/day may yield better results. Alternative dosing protocols may also improve efficacy since variations in the efficacy of caspofungin *in vivo* according to the dosage schedule employed were observed in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis.<sup>9</sup>

This work is the first study to analyse the susceptibility of this oomycete to inhibitors of  $\beta$ -glucans of the cell wall. It should be noted that we have only tested Brazilian isolates and

more detailed studies using geographically and genetically diverse isolates of *P. insidiosum* will be required before making any general conclusions regarding the susceptibility of this oomycete to caspofungin.

#### Funding

Financial support was provided by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development of Brazil). This manuscript is based on the thesis submitted by the first author in partial fulfillment of requirements for the attainment of the degree of Doctor in Veterinary Science, PPGC/FAVET, UFRGS, RS, Brazil.

#### Transparency declarations

None to declare.

#### References

1. Santurio JM, Alves HS, Pereira DB *et al.* Ftíose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34: 1–14.
2. Grooters AM. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 695–720.
3. Shenep JL, English BK, Kaufman L *et al.* Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1388–93.
4. McCormack PL, Perry CM. Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* 2005; 65: 2049–68.
5. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM *et al.* Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosos developed and evaluated. *Vaccine* 2003; 21: 2535–40.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard M38-A*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
7. Sekhon AS, Padhye AA, Garg AK. *In vitro* sensitivity of *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 427–32.
8. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R *et al.* Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 139–43.

Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against *P. insidiosum* strains

9. Vianen WW, de Marie S, ten Kate MT *et al*. Caspofungin: antifungal activity *in vitro*, pharmacokinetics, and effects on fungal load and animal survival in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 732–40.

10. Espine-Hingroff A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991). *J Clin Microbiol* 2003; 41: 403–9.

**TABELA SUPLEMENTAR DO ARTIGO 2 (NÃO PUBLICADA)**

Tabela 1: Procedência de 27 isolados de *Pythium insidiosum* avaliados no estudo.

N <sup>o</sup> do isolado	Espécie	Procedência
ATCC		Costa Rica
(58637)	Eqüino	
123	Eqüino	Cachoeira do Sul/ RS/Brasil
124	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
125	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
126	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
127	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
128	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
129	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
134	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
135	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
136	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
137	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
138	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
141	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
142	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
143	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
144	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
145	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
147	Eqüino	Botucatu/SP/Brasil
148	Eqüino	Santa Maria/RS/Brasil
152	Eqüino	Santa Maria/RS/Brasil
156	Eqüino	Santa Maria/RS/Brasil
167	Canino	Santa Maria/RS/Brasil
175	Eqüino	Uruguaiana/RS/Brasil
177	Eqüino	Santa Maria/RS/Brasil
178	Eqüino	Pantanal/MS/Brasil
179	Ovino	Cuiabá/MT/Brasil

RS: Rio Grande do Sul; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; SP: São Paulo

## **CAPÍTULO 3**

**COMPARAÇÃO DE DOIS TRATAMENTOS, CASPOFUNGINA E  
IMUNOTERAPIA, NA PITIOSE EXPERIMENTAL EM COELHOS**

**ARTIGO 3**

**Comparison between the immunotherapeutic and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits**

**Artigo submetido para publicação no Journal de Micologie Médicale**

Elsevier Editorial System(tm) for Journal de Mycologie Médicale  
Manuscript Draft

Manuscript Number: MYCMED-D-07-00026

Title: Comparison between the immunotherapeutic and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. Essai comparatif entre immunothérapie et caspofungine traitements de la pythiose expérimentale chez le lapin.

Article Type: Article original / original article

Keywords: *Pythium insidiosum*; pythiosis; caspofungin; immunotherapy; Pitum Vac; rabbits

Corresponding Author: Prof. Janio M. Santurio, Dr.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Janio M Santurio, Professor

Order of Authors: Janio M Santurio, Professor; Daniela B Pereira, MsC; Janio M. Santurio, Dr.; Sydney H Alves, Professor; Maria I Azevedo, UFSM Graduated Student; Flavio Silveira, UFSM - Graduated Student; Fernando F Costa, UFSM Graduated Student; Elisa S Sallis, Professor; Luciana Potter, Professor; Laerte Ferreiro, Professor

Abstract: Pythiosis is an emerging disease that is difficult to treat and is caused by the oomycete *Pythium insidiosum*. This study evaluated the efficacy of two different treatments for pythiosis using rabbits as an experimental model. Fifteen rabbits subcutaneously inoculated with *Pythium insidiosum* zoospores were divided into 3 groups of 5 animals (group 1, control; group 2, treated with Pitum Vac® immunotherapeutic; and group 3, treated with caspofungin). The treatments were started 25 days after the inoculation, and consisted of: 1) 8 doses of the immunotherapeutic administered at 14-day intervals; and 2) 1mg/kg/day of caspofungin during 20 consecutive days. The animals were necropsied eighteen weeks after the experiment onset, and lesion fragments were collected for histopathologic and morphometric analysis. The animals in the control group displayed larger lesion sizes compared to the animals treated with Pitum Vac or caspofungin ( $P<0.05$ ). The histological aspect of the lesions was similar between the groups under study, and the morphometric evaluation showed that the animals in groups 2 and 3 had lower amounts of hyphae in necrotic areas ( $P<0.05$ ). The results of the present study indicate that, even though the treatments did not



differ significantly, the immunotherapeutic treatment is still the best alternative to treat pythiosis due to its lower cost. Caspofungin fungistatic effect on *Pythium insidiosum* in addition to its high cost makes its use for the treatment of animal pythiosis impractical.

Manuscript

[Click here to download Manuscript: Comparision of.. JMM.doc](#)

1 **Comparison between the immunotherapeutic and caspofungin as agents to treat**  
2 **experimental pythiosis in rabbits**

3 **Essai comparatif entre immunothérapie et caspofungine traitements de la**  
4 **pythiose expérimentale chez le lapin**

5 **D. I. B. Pereira<sup>a,d</sup>, J. M. Santurio<sup>a,\*</sup>, S. H. Alves<sup>a</sup>, M. I. de Azevedo<sup>a</sup>, F.**  
6 **Silveira<sup>a</sup>, F. F. da Costa<sup>a</sup>, E. S. V. Sallis<sup>b</sup>, L. Pötter<sup>c</sup>; L. Ferreiro<sup>d,e</sup>.**

7 <sup>a</sup>Mycology Research Laboratory – LAPEMI, Department of Microbiology,  
8 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

9 <sup>b</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Pelotas  
10 (UFPel), Pelotas, RS, Brazil.

11 <sup>c</sup>Department of Animal Science, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
12 Santa Maria, RS, Brazil.

13 <sup>d</sup>Program of Pos-graduate in Veterinary Science, Universidade Federal do Rio  
14 Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

15 <sup>e</sup>Mycology Laboratory, Department of Veterinary Clinical Pathology, Faculdade de  
16 Medicina Veterinária (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

17

18

19

---

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

1 **Abstract:**

2 Pythiosis is an emerging disease that is difficult to treat and is caused by the  
3 oomycete *Pythium insidiosum*. This study evaluated the efficacy of two different  
4 treatments for pythiosis using rabbits as an experimental model. Fifteen rabbits  
5 subcutaneously inoculated with *Pythium insidiosum* zoospores were divided into 3  
6 groups of 5 animals (group 1, control; group 2, treated with Pitium Vac®  
7 immunotherapeutic; and group 3, treated with caspofungin). The treatments were  
8 started 25 days after the inoculation, and consisted of: 1) 8 doses of the  
9 immunotherapeutic administered at 14-day intervals; and 2) 1mg/kg/day of  
10 caspofungin during 20 consecutive days. The animals were necropsied eighteen  
11 weeks after the experiment onset, and lesion fragments were collected for  
12 histopathologic and morphometric analysis. The animals in the control group  
13 displayed larger lesion sizes compared to the animals treated with Pitium Vac or  
14 caspofungin ( $P<0.05$ ). The histological aspect of the lesions was similar between  
15 the groups under study, and the morphometric evaluation showed that the animals  
16 in groups 2 and 3 had lower amounts of hyphae in necrotic areas ( $P<0.05$ ). The  
17 results of the present study indicate that, even though the treatments did not differ  
18 significantly, the immunotherapeutic treatment is still the best alternative to treat  
19 pythiosis due to its lower cost. Caspofungin fungistatic effect on *Pythium*  
20 *insidiosum* in addition to its high cost makes its use for the treatment of animal  
21 pythiosis impractical.

1 KEYWORDS: *Pythium insidiosum*, pythiosis, caspofungin, immunotherapy,  
2 Pitium Vac, rabbits.

3

4 **Resumé:**

5 Pythiose est une maladie émergente très difficile à traiter et due au développement  
6 de l' oomycète *Pythium insidiosum*. Cet étude a évalué l'efficacité de deux  
7 différents traitements de la pythiose expérimentale chez le lapin. Quinze lapins  
8 inoculés par la voie sous-cutanée avec une suspension de zoospores de *Pythium*  
9 *insidiosum* ont été divisés en 3 groupes de 5 animaux (groupe 1, le contrôle;  
10 groupe 2, traité avec Pitium Vac® immunotherapeutic et groupe 3, traité avec  
11 caspofungine). Les traitements ont débuté 25 jours après l'inoculation et se  
12 composaient de: 1) 8 doses de l' immunotherapeutic administrés à 14 jours d'  
13 intervalle, et 2) 1mg/kg/jour de caspofungine pendant 20 jours consécutifs. Les  
14 animaux ont été necropsiés dix-huit semaines après le début de l' expérience, et  
15 morceaux des lésions ont été prélevés pour des analyses morphométrique et  
16 histopathologique. Les animaux du groupe contrôle ont développés lésions plus  
17 importante, par rapport à la dimension, que les lapins traités avec Pitium Vac ou  
18 caspofungine (P <0,05). L' aspect histologique des lésions était similaire entre les  
19 groupes étudiés, par contre, l' évaluation morphométrique a montré que les  
20 animaux dans les groupes 2 et 3 avaient des quantités d'hyphes inférieures dans  
21 les zones nécrosées (P <0,05). Les résultats de cet étude indiquent que, même si  
22 les traitements ne différaient pas significativement, le traitement avec l'

1 immunotherapic est le meilleur choix pour traiter pythiose en raison de son coût  
2 inférieur. L'effet fongistatique de la caspofungine sur *Pythium insidiosum* allié à  
3 son prix élevé, rend son utilisation impraticable pour le traitement des animaux  
4 avec pythiose.

5 MOTS-CLÉS: *Pythium insidiosum*, pythiose, caspofungine, immunothérapie,  
6 Pitium Vac, lapins.

7

## 8 **Introduction**

9       Pythiosis is an emerging disease of animals and humans in the tropical,  
10 subtropical and temperate regions of the world [23]. Most published reports  
11 describe this disease in horses and dogs. In horses, the disease manifests itself as  
12 an ulcerative, proliferative, pyogranulomatous lesion, most often involving skin  
13 and subcutaneous tissues of the legs and ventral body wall [14]. In dogs, the  
14 infection includes cutaneous/subcutaneous and gastrointestinal lesions [6]. In  
15 humans, the disease occurs in a localized form, as well as in systemic or vascular  
16 forms [23]. Pythiosis is caused by *Pythium insidiosum*, a fungus-like  
17 microorganism of the Straminopila kingdom. Pythiosis can be a life-threatening  
18 infection in all species if not treated [10].

19       Successful resolution of pythiosis with antifungal treatment alone is  
20 difficult due to *Pythium* spp. cell wall and cytoplasmic membrane compositions.  
21 While true fungi contain chitin and  $\beta$  glucan in their cell wall, stramenopilan  
22 microorganisms are devoid of ergosterol, the target of most antifungal drugs [5,6].

1 Various attempts to treat animals as well as humans with antifungal drugs such as  
2 amphotericin B, ketoconazole, miconazole, fluconazole, itraconazole and  
3 terbinafine have yielded variable, and sometimes contradictory results [1-4, 6, 7,  
4 9, 17, 18, 20, 22]. The lack of therapeutic choices for pythiosis has encouraged the  
5 use of immunotherapy [10]. Initially proposed by Miller [12], immunotherapy  
6 constitutes an important alternative for the treatment of equine pythiosis, with  
7 cure rates that vary around 70-80% [10, 15]. Wanachiwanawin et al. [23] achieved  
8 the cure in 50% of the cases when using immunotherapy to treat arterial pythiosis  
9 in humans. However, immunotherapy did not show satisfactory results in dogs  
10 and cats [11]. Although the cure rates obtained using immunotherapy for the  
11 treatment of pythiosis are considered good and inexpensive, there are cases that  
12 do not respond to this therapy and demand new approaches.

13         Hope for the treatment of pythiosis with antifungal agents appeared when  
14 a new group of antimycotics derived from echinocandins was discovered.  
15 Caspofungin (L-743, 872, MK-0991) is a semisynthetic derivative of  
16 pneumocandin Bo, whose mechanism of action consists of blocking the synthesis  
17 of  $\beta(1,3)$ -D-glucan of the fungal cell wall through the non-competitive inhibition  
18 of the enzyme  $\beta(1,3)$ -D-glucan synthase [8]. This drug can be efficient against  
19 *Pythium insidiosum* since this oomycete contains great amounts of  $\beta$  glucan in its  
20 cell wall [6].

1           In this work, rabbits were experimentally infected with *Pythium*  
2 *insidiosum* zoospores in order to evaluate the efficacy of two different treatments  
3 for pythiosis: immunotherapy and caspofungin administration.

4

## 5 **Materials and methods**

### 6 *Pythium insidiosum*

7           A *Pythium insidiosum* strain (CBS 101555), isolated from a case of equine  
8 pythiosis in Brazil, was employed. This strain was initially cultivated in Corn  
9 Meal Agar at 27°C and subsequently subjected to zoosporogenesis. The resulting  
10 zoospores were inoculated into the rabbits.

11

### 12 **Zoosporogenesis**

13           Previously autoclaved pieces of *Paspalum notatum* grass were distributed  
14 over *Pythium insidiosum* cultures and incubated at 37°C for 5 days. Infected grass  
15 pieces were transferred to an induction medium containing solution 1 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
16 (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), 500 mL of distilled water) and  
17 solution 2 (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.5 M), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.5 M), 250 mL of distilled water).  
18 The induction medium final composition was 0.5 mL of solution 1, 0.1 mL of  
19 solution 2, and 1,000 mL of sterile distilled water. Induction medium containing  
20 infected grass pieces was incubated at 37°C for 8 h. The grass pieces were  
21 observed under a microscope and the zoospores were counted using a Neubauer  
22 chamber.

## 1 Rabbits and treatments

2 Fifteen three-month-old New Zealand rabbits, including males and  
3 females, were used in this work. All animals received 1 mL of induction medium  
4 containing approximately 20,000 viable *Pythium insidiosum* zoospores applied  
5 subcutaneously in the right costal region, as described by Santurio et al. [19].  
6 Inoculated rabbits were checked every 3 days by measuring the subcutaneous  
7 nodular area (cm<sup>2</sup>) using a sliding caliper. Rabbits that developed pythiosis lesions  
8 were divided into 3 groups of 5 rabbits each: group 1 (control, without treatment);  
9 group 2 (treated with the immunotherapeutic Pitium Vac - LAPEMI/EMBRAPA,  
10 developed by Santurio et al. [19]); and group 3 (treated with caspofungin -  
11 Cancidas® - MSD SHARP & DOHME GmbH, Haar, Germany).

12 The treatments were started 25 days after zoospore inoculations. Rabbits in  
13 Group 2 received 2 mL of the immunotherapeutic by the subcutaneous route in the  
14 left costal region. This procedure was repeated every 14 days, at 8 time points.  
15 Caspofungin in the form of 50 mg was commercially acquired. The drug was  
16 dissolved in sterile distilled water according to the manufacturer's instructions,  
17 and applied at a dosage of 1 mg/kg/day by the intraperitoneal route during 20 days

18 The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of Federal  
19 University of Santa Maria.

20

## 21 Necropsy and histopathologic and morphometric analyses



1 All rabbits were necropsied after 18 weeks of observation. Representative  
2 fragments of the subcutaneous lesions were fixed in 10% buffered formalin,  
3 routinely processed for histopathologic evaluation, and stained with Hematoxylin  
4 & Eosin (H&E) or Grocott's stain. An Olympus Oly-200 color video camera  
5 coupled to a BX51/BX52 Olympus binocular microscope was used for image  
6 capturing. Images were acquired at 400X magnification. Hyphae were quantified  
7 using Alpha Ease FC software (Alpha Innotech Corporation version 4.0). Seven  
8 microscopic fields were used for each slide. The images were converted into 255  
9 grayscale intensities. Among different intensity ranges, a dark range (values 0 to  
10 175) corresponded to hyphae stained by silver in Grocott's stain, and was selected  
11 using a selection tool. The data obtained were submitted to statistical analysis.

12

### 13 Statistics

14 The areas of the lesions ( $\text{cm}^2$ ) were transformed into percentage and  
15 submitted to analysis of variance and F-test using a significance level of 5%. The  
16 Tukey test was carried out when differences between the treatments were  
17 detected. Regression analysis of the dates of the measurements was also  
18 performed, with adjustments in the polynomial model made up to the third order.

19

### 20 Results

21 All rabbits developed granulomatous lesions with areas ranging from 4 to  
22  $31.3 \text{ cm}^2$  25 days after subcutaneous inoculation with *Pythium insidiosum*

1 zoospores. One animal from each group died between the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> weeks after  
2 inoculation; necropsies indicated that their death was caused by pythiosis  
3 metastases in the lungs and kidneys. The remaining animals were kept in their  
4 groups until the end of the experiment.

5         When the mean percent lesion areas were compared using the Tukey test,  
6 the animals in the control group showed larger lesion sizes as compared to the  
7 animals treated with Pitium Vac or caspofungin ( $P<0.05$ ). The evolution of the  
8 lesions in the course of the experimental period showed a quadratic behavior for  
9 all treatments ( $P<0.0001$ ). Subcutaneous lesion areas exhibited a reduction in their  
10 increase during the treatment in the rabbits that received caspofungin; however,  
11 lesions resumed growth after the end of the drug administration (Figure 1).

12         The subcutaneous lesions cut surfaces were multilobulated, hard, white-  
13 pinkish and vascularized. The histopathology of the lesions stained with H&E was  
14 characterized by the presence of multifocal to coalescent necrotic areas delimited  
15 by inflammatory infiltrates predominantly constituted by PMN (eosinophils).  
16 Hyphae-like structures surrounded by irregular, eosinophilic material could be  
17 observed in the necrotic areas and corresponded to Splendore-Hoepli reactions  
18 (Figure 2). Some of these reactive areas were delimited by Langhans' giant cells;  
19 some of these cells had hyphae in their interior. There was also intense  
20 proliferation of fibrous connective tissue cells, and presence of eosinophils,  
21 plasma cells, lymphocytes, macrophages, some giant cells and epithelioid cells.  
22 Irregularly ramified, scarcely septate hyphae with thick brown walls were

1 visualized with Grocott staining; these were located especially in the periphery of  
2 the necrotic areas.

3 The morphometric analysis demonstrated that the lesions in the animals of  
4 the control group had a greater number of hyphae as compared to those in the  
5 rabbits belonging to the groups treated with Pitium Vac or caspofungin ( $P<0.05$ )  
6 (Figure 3).

7

## 8 Discussion

9 Rabbits are used to study serology and efficacy of immunotherapy for the  
10 treatment of pythiosis nowadays because this disease can be experimentally  
11 reproduced in this species but not in others [11, 19]. In the present study, the  
12 development of subcutaneous nodules 25 days after inoculation with viable  
13 *Pythium insidiosum* zoospores and the histological characteristics of the lesions  
14 were similar to those described in other studies [13, 19]. These findings indicate  
15 that the experimental reproduction of pythiosis in the rabbits was successful.

16 Even though none of the animals in the group treated with Pitium Vac  
17 showed signs of clinical cure, their lesion areas showed less growth when  
18 compared to those of the animals in the control group ( $P< 0.05$ ). These results  
19 differ from other study [19], that reported the cure of two animals using the same  
20 number of doses and the same immunotherapeutic formulation. We believe that the  
21 absence of complete lesion regression may have happened due to the animals'  
22 immunological status, since the efficacy of the immunotherapeutic used in the

1 present work has been previously demonstrated in rabbits with experimental  
2 pythiosis [19] and in horses naturally infected by *Pythium insidiosum* in Brazil  
3 [15].

4         Some authors affirm that the immunotherapeutic's mechanism of cure  
5 involves a change from a Th2 lymphocyte-mediated response to a Th1  
6 lymphocyte-mediated reaction, as evidenced by changes in the interleukin and  
7 histopathological lesion patterns [10, 21, 23]. In this study, we did not observe  
8 differences in the pattern of the histological findings between the groups studied.  
9 On the other hand, the lower number of hyphae observed in the necrotic areas of  
10 the animals treated with Pitium Vac suggest that this immunotherapeutic was able to  
11 stimulate an immune response that resulted in destruction of *Pythium insidiosum*  
12 hyphae.

13         We are currently developing studies on the *in vitro* susceptibility of  
14 *Pythium insidiosum* to several antifungal drugs, including caspofungin. The *in*  
15 *vitro* evaluation of 26 Brazilian *Pythium insidiosum* isolates showed that this  
16 oomycete is poorly susceptible to caspofungin, and the *in vivo* observations  
17 revealed that this drug displays fungistatic activity in rabbits with experimental  
18 pythiosis [16]. In the present study, the area of the lesions in animals treated with  
19 caspofungin showed less growth as compared to the control group ( $P < 0.05$ ). This  
20 finding reinforces that caspofungin effect on *Pythium insidiosum* is fungistatic.  
21 This drug was more effective in containing the lesions than Pitium Vac, as  
22 evidenced by: slow growth of the lesions even 12 weeks after the end of the

1 treatment; quantification of hyphae in Grocott's staining; and no significant  
2 difference as compared to the Pitium Vac group.

3         Notwithstanding, cure was not achieved using caspofungin, whereas it has  
4 been reported with the use of Pitium Vac [19]. Prolonged therapies with  
5 caspofungin are very expensive, and this justifies the treatment for only 20 days.  
6 The application of caspofungin for a time extent similar to that used for Pitium  
7 Vac would require approximately 115 bottles of the drug. This is impracticable,  
8 since the cost of this antifungal drug is something around US\$ 1,000/bottle in  
9 Brazil. Our observations add to other studies [2-4, 7, 9, 18] that report the  
10 difficulty in treating pythiosis with antifungal drugs.

11         In conclusion, the comparison of two therapies based on different  
12 mechanisms to treat pythiosis provided evidence that, even though there was no  
13 difference between the treatments evaluated, immunotherapy is still the best  
14 alternative to treat pythiosis due to its lower cost and possibility of cure, in spite  
15 of the longer treatment time required. Caspofungin's lack of fungicidal effect on  
16 *Pythium insidiosum*, in addition to its high cost and inability to cure, makes its use  
17 for the treatment of pythiosis in animals impracticable, especially in the horse, the  
18 species in which this disease is more frequently observed.

19

#### 20 **Acknowledgments**

21         This work was supported by CNPq (National Council for Scientific and  
22 Technological Development of Brazil). This manuscript is based on the thesis

1 submitted by the first author in partial fulfillment of requirements for the  
2 obtainment of the degree of Doctor in Veterinary Science, PPGC/FAVET, UFRGS,  
3 RS, Brazil.

4 We thank Cristiane Danesi and Adriano Tony Ramos for the  
5 morphometric analysis.

6

#### 7 **References**

- 8 [1] Bissonnette KW, Sharp NJH, Dykstra MH, Robertson IR, Davis B, Padhye A  
9 A, et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. *J Med*  
10 *Vet Mycol* 1991; 29:39-44.
- 11 [2] Bosco SMG, Bagagli E, Araújo Jr JP, Candeias JMG, Franco MF, Marques  
12 MEA, et al. Human pythiosis, Brasil. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:715-718.
- 13 [3] Dykstra MJ, Sharp NJH, Olivry T, Hillier A, Murphy KM, Kaufman, et al. A  
14 description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. *Med Mycol*  
15 1999; 37:427-433.
- 16 [4] English PB, Frost AJ. Phycomycosis in a dog. *Aust Vet J* 1984; 61: 291-292.
- 17 [5] Foil CS. Update on pythiosis (oomycosis). *The North American Veterinary*  
18 *Conference* 1996; 57-63.
- 19 [6] Grooters AM. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Vet*  
20 *Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33:695-720.
- 21 [7] Jaeger GH, Rotstein DS, Law JM. Prostatic pythiosis in a dog. *J Vet Intern*  
22 *Med* 2002; 16:598-602.

- 1 [8] Letscher-Bru V, Herbrecht R. Caspofungin: the first representative of a new  
2 antifungal class. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:513-521.
- 3 [9] McMullan WC, Joyce JR, Hanselka BV, Heitmann JM. Amphotericin B for  
4 the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. *J Am Vet*  
5 *Med Assoc* 1977; 170:1293-1297.
- 6 [10] Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine  
7 formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with  
8 pythiosis. *Vaccine* 2003; 21:2797-2804.
- 9 [11] Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections  
10 caused by *Pythium insidiosum*. *Med Mycol* 2005; 43:477-486.
- 11 [12] Miller RI. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and  
12 surgery. *Aust Vet J* 1981; 57:377-382.
- 13 [13] Miller RI, Campbell RSF. Experimental pythiosis in rabbits. *Sabouraudia*  
14 1983; 21:331-341.
- 15 [14] Miller RI, Campbell RSF. The comparative pathology of equine cutaneous  
16 phycomycosis. *Vet Pathol* 1984; 21:325-332.
- 17 [15] Monteiro AB. MS. dissertation. Immunotherapy of equine pythiosis: testing  
18 the efficacy of a biological and evaluation of the leukocytic response to the  
19 treatment in horses naturally infected with *Pythium insidiosum*. Federal University  
20 of Santa Maria, Brazil 1999; 54p.

- 1 [16] Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Pötter L, Spanamberg A, et  
2 al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum*  
3 strains isolated from animals. J Antimicrob Chemoter 2007; doi: 10.1093/jac/dkm  
4 332.
- 5 [17] Rakish PM, Grooters AM, Tang K. Pythiosis in two cats. J Vet Diagn Invest  
6 2005; 17:262-269.
- 7 [18] Rivierre C, Laprie C, Guiard-Marigny O, Bergeaud P, Berthelemy M, Guillot  
8 J. Pythiosis in Africa. Emerg Infect Dis 2005; 11:479-481.
- 9 [19] Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Festugatto R, Lubeck I, Sallis ESV, et al.  
10 Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosum developed and  
11 evaluated. Vaccine 2003; 21:2535-2540.
- 12 [20] Shenep JL, English BK, Kaufman L, Pearson TA, Thompson JW, Kaufman  
13 RA, et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to  
14 *Pythium insidiosum* in a child. Clin Infect Dis 1998; 27:1388-1393.
- 15 [21] Thitithanyanont A, Mendoza L, Chuansumrit A, Prachartam R,  
16 Laothamatas J, Sathapatayavongs B, et al. Use of an immunotherapeutic vaccine  
17 to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*.  
18 Clin Infect Dis 1998; 27:1394-1400.
- 19 [22] Triscott JA, Weedon D, Cabana E. Human subcutaneous pythiosis. J Cutan  
20 Pathol 1993; 20:267-271.

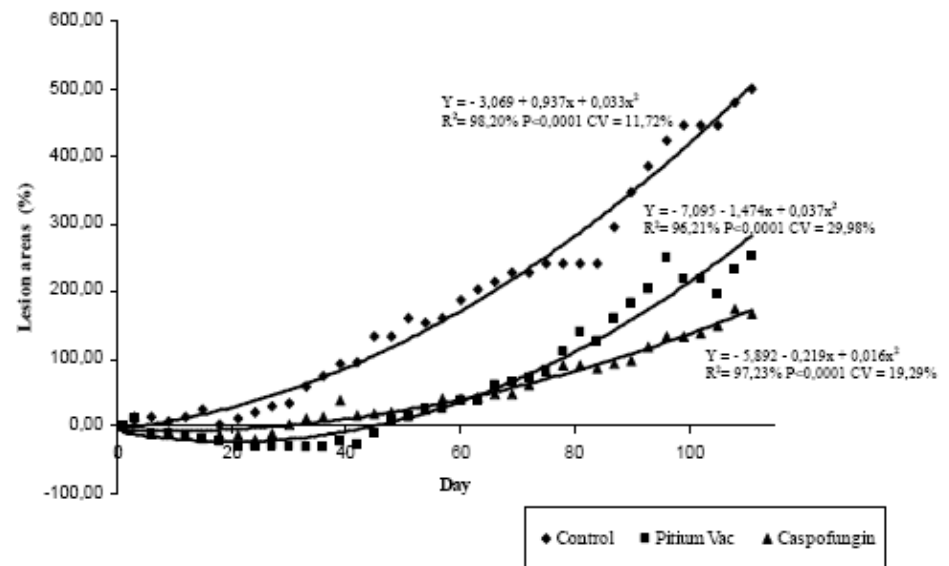


- 1 [23] Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P,
- 2 Sathapatayavongs B, Suwanagool P, et al. Efficacy of immunotherapy using
- 3 antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans.
- 4 Vaccine 2004; 22:3613-3621.

**Figure 1:** Percent variation of subcutaneous lesion areas in rabbits experimentally inoculated with *Pythium insidiosum* zoospores and treated with caspofungin or the immunotherapeutic Pitium Vac.

**Figure 1:** Pourcentage de variation de la taille des lésions sous-cutanées expérimentalement produites chez les lapins inoculés avec des zoospores de *Pythium insidiosum* et traités avec la caspofungine ou le immunotherapeutic Pitium Vac.

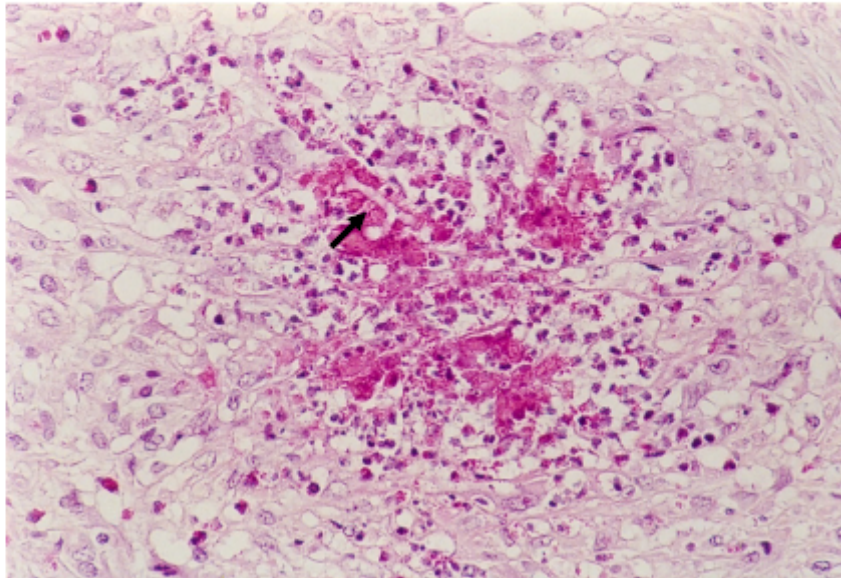
Figure



**Figure 2:** Subcutaneous tissue of a rabbit inoculated with *Pythium insidiosum* and necropsied after 18 weeks. Necrotic area with cell debris and hyphae-like structures surrounded by Splendore-Hoepli reactive areas (arrow). HE. 10X objective.

**Figure 2:** Tissu sous-cutané d'un lapin inoculé avec *Pythium insidiosum* et necropsié après 18 semaines. L'aspect histologique démontre l' envahissement et necrose tissulaire avec présence de débris cellulaires et ébauchés d'hyphes avec importante réaction éosinophile à leur périphérie (Phénomène de Splendore – Hoepli)[flèche]. HE. 10 X objectif.

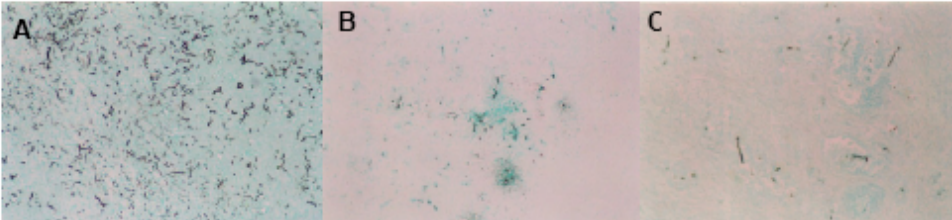
Figure



**Figure 3:** Subcutaneous tissue of rabbits inoculated with *Pythium insidiosum* and necropsied after 18 weeks. The structures stained black correspond to *Pythium insidiosum* hyphae. Panels A (Control); B (Pitium Vac) and C (Caspofungin) show the differences in the amount of hyphae between the treatments. Grocott. 10X objective.

**Figure 3:** Tissu sous-cutané d'un lapin inoculé avec *Pythium insidiosum* et necropsié après 18 semaines. Les structures pigmentés en noir correspondent à des hyphes de *Pythium insidiosum*. Sections A (Contrôle) B (Pitium Vac) et C (Caspofungine) mise en évidence les différences entre la quantité des hyphes par rapport aux traitements. Grocott. 10 X objectif.

Figure



**TABELA SUPLEMENTAR DO ARTIGO 3 (NÃO INCLUÍDA PARA  
PUBLICAÇÃO)**

Tabela 1: Valores médios percentuais das áreas de lesões subcutâneas dos coelhos inoculados com zoósporos de *Pythium insidiosum*.

Período (dias)/ datas de medidas	Área de lesão (%) Grupo Controle	Área de lesão (%) Grupo Pitium Vac	Área de lesão (%) Grupo Caspofungina
0	9,25	12,40	14,95
3	15,13	-11,29	-9,36
6	8,64	-11,04	-9,03
9	13,51	-14,03	-11,70
12	24,86	-17,50	-16,25
15	3,78	-22,09	-11,70
18	12,43	-27,98	-12,70
21	20,54	-27,98	-18,92
24	29,18	-29,03	-10,36
27	33,51	-29,03	3,81
30	60,00	-30,40	12,70
33	75,67	-30,40	15,05
36	91,89	-22,00	40,07
39	94,59	-27,00	16,52
42	134,05	-11,29	18,72
45	134,05	10,48	21,73
48	160,54	13,70	15,71
51	154,59	26,61	24,54
54	160,54	26,61	41,60
57	187,56	39,75	41,60
60	202,16	39,75	44,14
63	214,59	60,72	47,29
66	228,10	65,32	47,62
69	228,10	73,38	61,87
72	241,62	83,06	82,07
75	241,62	110,16	90,43
78	241,62	139,75	90,43
81	241,62	126,85	87,00
84	294,59	160,72	92,10
87	347,02	182,74	97,12
90	384,86	203,70	118,52
93	422,70	250,00	132,44
96	445,94	219,59	132,44
99	445,94	219,59	138,26
102	445,94	196,20	148,29
105	478,37	233,06	173,37
108	500,00	251,29	167,02



### 3 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a pitiose vem merecendo destaque na micologia veterinária e humana, principalmente devido às dificuldades encontradas no tratamento das espécies afetadas e ao aumento do número de casos diagnosticados (SANTURIO *et al.*, 2006a). Diversos protocolos de terapia com fármacos antifúngicos têm sido utilizados. Entretanto, a ausência de ergosterol na membrana citoplasmática dos oomicetos (KWON-CHUNG, 1994; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; MOORE-LANDECKER, 1996; GROOTERS, 2003) explica o insucesso das terapias, já que o ergosterol constitui o componente alvo de ação da maioria dos antifúngicos disponíveis e mais comumente utilizados na terapêutica clínica (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Os artigos que descrevem quimioterapia antifúngica para pitiose em animais e humanos, com fármacos como anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol e terbinafina têm demonstrado resultados variáveis e muitas vezes contraditórios, quando comparados aos resultados dos testes *in vitro* (McMULLAN *et al.*, 1977; GONZALES *et al.*, 1979; FOIL *et al.*, 1984; ENGLISH & FROST, 1984; BISSONNETTE *et al.*, 1991; TRISCOTT *et al.*, 1993; SHENEP *et al.*, 1998; DYKSTRA *et al.*, 1999; JAEGER *et al.*, 2002; GROOTERS, 2003; RIVIERRE *et al.*, 2005; PUPAIBOOL *et al.*, 2006).

Santurio *et al.* (2006a) destacam que, em virtude do *Pythium insidiosum* resistir à maioria dos tratamentos antifúngicos, as pesquisas com imunoterápicos avançaram de maneira significativa a partir de 1998. Desta forma, a imunoterapia tornou-se uma importante ferramenta terapêutica na pitiose equina, apresentando índices de cura que variam em torno de 70-80% (MONTEIRO, 1999; MENDONZA *et al.*, 2003). Embora, este método tenha curado aproximadamente 100% dos bovinos tratados, salienta-se que em caninos e felinos não foram demonstrados resultados satisfatórios (MENDOZA & NEWTON, 2005). Mesmo que a imunoterapia apresente bons índices de cura e baixo custo, deve-se levar em consideração a ocorrência dos casos não responsivos que cursam com 100% de mortalidade e, portanto, demandam a procura por novas terapias.

Esperanças no tratamento da pitiose com antifúngicos surgiram com o acetato de caspofungina (L-743, 872, MK-0991), um derivado semi-sintético da pneumocandina Bo, que bloqueia a síntese de  $\beta(1,3)$ -D-glucana da parede celular fúngica por inibição não competitiva da enzima  $\beta(1,3)$ -D-glucana sintase (DERESINSKI & STEVENS, 2003; KARTSONIS *et al.*, 2003; LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003; MASCHMEYER

& GLASMACHER, 2005). Acredita-se que este fármaco possa ser eficaz contra *Pythium insidiosum*, uma vez que este oomiceto apresenta grande quantidade de  $\beta$  glucana na parede celular (GROOTERS, 2003).

Shenep *et al.* (1998) afirmam que a cura farmacológica da pitiose com antifúngicos é possível, porém, sempre deve ser acompanhada por testes de suscetibilidade *in vitro*. Todavia, estudos de suscetibilidade a antifúngicos com *Pythium insidiosum* são escassos, não havendo dados de padronização para testes *in vitro* com este oomiceto. Sekhon *et al.* (1992) e Shenep *et al.* (1998) realizaram testes *in vitro* com *Pythium insidiosum*, avaliando a suscetibilidade a anfotericina B, 5-fluorocitocina, terbinafina e azólicos sem, no entanto, seguir a metodologia padronizada pelo CLSI. A inovação do presente estudo foi a realização dos testes de suscetibilidade *in vitro* utilizando a técnica de macrodiluição seguindo os parâmetros preconizados pelo método de referência M38-A do CLSI, para verificar a suscetibilidade de *Pythium insidiosum* a caspofungina. O documento M38-A foi aprovado em agosto de 2002 e padroniza os métodos para testes de suscetibilidade de fungos filamentosos que causam infecções fúngicas invasivas, incluindo *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* e *Sporotrix schenkii* (NCCLS, 2002). Entretanto, este método não está padronizado para oomicetos e nem para as equinocandinas, não havendo definição de CIMs para estes fármacos (LETCHER-BRU & HERBRECHT, 2003; ROMERO *et al.*, 2005). Desta forma, a partir deste experimento, foram geradas informações que podem ser utilizadas em estudos de suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* a outros fármacos antifúngicos. Conseqüentemente, a utilização de um método de referência, reduz os riscos de discrepâncias entre resultados.

O inóculo utilizado nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi preparado a partir de uma suspensão de zoósporos de *Pythium insidiosum*. Para a obtenção dos zoósporos utilizou-se o protocolo de zoosporogênese baseado na técnica descrita por Mendoza & Prendas (1988), com algumas modificações em função da quantidade de inóculo exigida para os testes *in vitro* e reprodução experimental da enfermidade (**Capítulo 1; Artigo 1**). A quantidade de zoósporos utilizada para a inoculação dos animais experimentais (aproximadamente 20.000 zoósporos viáveis/mL) foi baseada nos estudos de Santurio *et al.* (2003) que reproduziram a doença em coelhos através da inoculação subcutânea de 17.500 zoósporos viáveis/mL. Já para os ensaios de suscetibilidade *in vitro*, em razão de não existir padronização para testes com *Pythium insidiosum* e como não há informações de valores de quantificação de zoósporos, pois Sekhon *et al.* (1992) utilizaram suspensão

de hifas ajustada por espectrofotometria e Shenep *et al.* (1998) não especificaram o inóculo utilizado em seus estudos, estimou-se que a concentração ideal de zoósporos do inóculo ficasse situada na faixa de  $2-3 \times 10^4$  zoósporos /mL.

Avaliando a técnica de zoosporogênese, Mendoza & Prendas (1988) em um estudo realizado com nove isolados de *Pythium insidiosum* observaram que o número máximo de zoosporângios foi obtido após uma hora e meia de incubação em Meio de Indução a 37°C, quando utilizaram o cultivo prévio em grama em meio agar água a 2% por 24 horas a 37°C. Já ao utilizarem o cultivo em fragmentos de grama em outros meios como agar Sabouraud e CMA, verificaram que o tempo de incubação aumentou para quatro dias e o período de maior produção de zoosporângios ocorreu após cinco horas e meia de incubação. No presente estudo experimental, o protocolo utilizou o meio de CMA para o cultivo de *Pythium insidiosum* em fragmentos de grama, pois os isolados testados não apresentaram crescimento em meio agar água a 2%. Observou-se que no meio de CMA, houve ótimo crescimento no 5º dia de incubação a 37°C e quando realizada a indução da zoosporogênese, o número máximo de zoósporos foram obtidos entre seis e oito horas de incubação. Estes resultados foram similares aos citados previamente por Mendoza & Prendas (1988). Nessas condições de zoosporogênese, verificou-se que 87,5% dos isolados produziram 20.000 ou mais zoósporos/mL. Desta forma, pode-se inferir que o referido protocolo é o mais indicado quando se deseja obter zoósporos em quantidades ideais para reprodução da enfermidade em animais experimentais e realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos, amenizando as dificuldades de zoosporogênese, muitas vezes encontradas quando se trabalha com *Pythium insidiosum*.

No ensaio de suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* ao acetato de caspofungina (**Capítulo 2, Artigo 2**), a padronização do inóculo, utilizando contagem de zoósporos e posterior diluição 1:10 em caldo RPMI 1640, atingindo a concentração final de  $2-3 \times 10^3$  zoósporos/mL, permitiu a reprodutibilidade dos testes *in vitro*. Embora o documento M38-A preconize que as concentrações de inóculos viáveis de esporangiosporos ou conídios se situem na faixa de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL (NCCLS, 2002), em virtude das características do *Pythium insidiosum*, o inóculo utilizado neste estudo situou-se abaixo desse valor, pois não foi possível induzir-se produção de zoósporos em quantidades próximas aos valores preconizados pelo documento. A vantagem da contagem de zoósporos em câmara de Neubauer é que através desse método pode-se quantificar o inóculo. Além disso, salienta-se que o ajuste do inóculo por

espectrofotometria não foi possível, uma vez que as suspensões de zoósporos não produziram turbidez do meio. A opção por não utilizar a preparação do inóculo com suspensão de hifas ajustada por espectrofotometria, como citada por Sekhon *et al.* (1992), foi baseada nos estudos de Espinel-Ingroff *et al.* (1997) que citam que a preparação de inóculo com suspensão de hifas não é confiável e afirmam que ocorrem diferenças de até três diluições entre as CIMs, quando as mesmas são comparadas com testes realizados com inóculos preparados com suspensão de conídios.

Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* podem ser influenciados pelo tipo de meio utilizado nos ensaios. O caldo de RPMI 1640 tem sido extensivamente avaliado para testes de suscetibilidade *in vitro* de leveduras e fungos filamentosos, demonstrando bons resultados de reprodutibilidade (GIL-LAMAIGNERE *et al.*, 2005). Neste estudo, os 27 isolados de *Pythium insidiosum* testados apresentaram crescimento visível e homogêneo de hifas em caldo RPMI, em 24 horas a 37<sup>0</sup>C, permitindo a fácil leitura das CIMs. Resultados similares são citados por Gil-Lamaignere *et al.* (2005) ao avaliarem a influência do meio na leitura das CIMs de caspofungina, voriconazol e posaconazol em testes de suscetibilidade com zigomicetos.

O documento M38-A não padroniza os testes de suscetibilidade para acetato de caspofungina nem para outros fármacos do grupo das equinocandinas. As determinações das CIMs de fungos filamentosos e leveduras ao acetato de caspofungina tem seguido os dados do CLSI preconizados para outros fármacos, assim como também, tem adotado vários critérios de inibição de crescimento que variam de 50-100% em diferentes tempos de incubação (ESPINEL-INGROFF, 2003). Este fato, aliado a ausência de padronização de testes *in vitro* para *Pythium insidiosum*, justifica o emprego de três critérios de leituras da CIM: CIM0 (100% de inibição do crescimento); CIM1 (90% de inibição do crescimento) e CIM2 (50% de inibição do crescimento). De forma similar, outros ensaios *in vitro* com fungos filamentosos que avaliaram a suscetibilidade ao acetato de caspofungina, também utilizaram diferentes critérios na leitura das CIMs, em função da ausência de determinação de pontos de corte para este fármaco (ESPINEL-INGROFF, 1998; ESPINEL-INGROFF., 2003; GIL-LAMAIGNERE *et al.*, 2005; VIANEN *et al.*, 2006). Alternativamente, a detecção de alterações morfológicas nas hifas, definida como concentração efetiva mínima (CEM) por Kurtz *et al.* (1994) pode se constituir numa forma mais adequada para se avaliar o ponto de corte da suscetibilidade *in vitro* para equinocandinas que a convencional CIM (ESPINEL-INGROFF, 2003). Além disso, Letcher-Bru & Herbrecht (2003) consideram o método de referência do CLSI como

pouco adequado para avaliação da suscetibilidade de fungos filamentosos ao acetato de caspofungina, uma vez que as equinocandinas atuam essencialmente nas zonas de crescimento das hifas, o que dificulta a visualização e quantificação da CIM. A importância da CEM como método de determinação do ponto de corte da suscetibilidade de fungos filamentosos ao acetato de caspofungina foi demonstrada por Arikan *et al.* (2001) ao avaliar a suscetibilidade de *Aspergillus* e *Fusarium* a este fármaco. Estes autores observaram que as CEMs para *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* foram, respectivamente, 3 e 10 vezes menores que as CIMs em 24 horas de incubação. Espinel-Ingroff (2003) afirma que além das CEMs para caspofungina serem mais estáveis e apresentarem menores valores que as CIMs, sofrem menor variação com o aumento do tempo de incubação. Embora os estudos demonstrem que a CEM é o método mais confiável para identificar-se o ponto de corte da CIM do acetato de caspofungina, neste experimento, não foi possível determinar-se a CEM nos isolados de *Pythium insidiosum* avaliados, uma vez que não foram constatadas alterações morfológicas das hifas em microscopia ótica.

No presente estudo, 51,8% dos isolados de *Pythium insidiosum* requereram CIMs de 64 µg/mL, quando considerada a leitura CIM0 e 88,8% produziram CIMs que variaram de  $\geq 8$  µg/mL a 64 µg/mL quando determinou-se a leitura parcial MIC1. Esse resultado associado ao fato que 62,9% dos isolados avaliados apresentaram concentração fungicida mínima de 64 µg/mL, sugerem que *Pythium insidiosum* é pouco suscetível ao acetato de caspofungina, mesmo que 55,5% das amostras tenham produzido CIMs menores, situadas entre 2 e 4 µg/mL, quando a leitura parcial foi realizada considerando-se a CIM2. Estudos demonstram que este fármaco apresenta atividade *in vitro* contra espécies de *Candida* e *Aspergillus* spp., com CIMs e CEMs de 1 µg/mL, respectivamente (McCORMACK & PERRY, 2005) e possui pouca atividade contra *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp. (BARTIZAL *et al.*, 1997; ESPINEL-INGROFF, 1998), zigomicetos (DEL POETA *et al.*, 1997; PFALLER *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 2005) e *Fusarium* spp. (DEL POETA *et al.*, 1997; PFALLER *et al.*, 1998; ARIKAN *et al.*, 2001) geralmente com CIMs acima de 16 µg/mL.

A repetibilidade dos resultados do ensaio *in vitro* com acetato de caspofungina observada neste experimento, demonstrou que a técnica de macrodiluição padronizada pela Norma M38-A do CLSI foi segura e confiável, sugerindo-se desta forma, que a mesma deve ser adotada como metodologia padrão para a realização de testes de suscetibilidade de *Pythium insidiosum* a outros fármacos antifúngicos.

Diversas tentativas de reprodução experimental da pitiose em espécies naturalmente suscetíveis foram feitas. Porém, em nenhuma delas obteve-se sucesso (MENDOZA & NEWTON, 2005). Entretanto, é possível reproduzir-se a doença por meio da inoculação subcutânea de zoósporos de *Pythium insidiosum* em coelhos, os quais desenvolvem nódulos que evoluem para fibrogranulomas eosinofílicos (MILLER & CAMPBELL, 1983a). Desta forma, esta espécie tem sido utilizada como modelo experimental em estudos sorológicos e de eficácia da imunoterapia na pitiose (MILLER & CAMPBELL, 1983a; LEAL *et al.*, 2002; SANTURIO *et al.*, 2003; LEAL *et al.*, 2005; MENDOZA & NEWTON, 2005). A inoculação experimental de 15 coelhos com 20.000 zoósporos/mL por via subcutânea, produziu o desenvolvimento de nódulos subcutâneos, firmes, circunscritos e aderidos à pele, com tamanhos que variaram de 4 to 31.3 cm<sup>2</sup>, 25 dias após a inoculação (**Capítulo 3; Artigo 3**). Tanto a reprodução experimental da doença, como a histologia das lesões caracterizada pela presença de áreas de necrose com hifas de *Pythium insidiosum* rodeadas por reações de Splendore-Hoeppli e intensa proliferação de tecido conjuntivo fibroso com presença de eosinófilos, plasmócitos, linfócitos, macrófagos e células gigantes foram similares às previamente descritas por Miller & Campbell (1983a) e Santurio *et al.* (2003). Um achado interessante observado neste estudo foi a ocorrência de reações de Splendore-Hoeppli, não relatadas por esses autores. Estas reações são frequentemente observadas na histopatologia das lesões de pitiose em eqüinos (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES *et al.*, 1993), caninos (FISCHER *et al.*, 1994), bovinos (MILLER *et al.*, 1985; PÉREZ *et al.*, 2005), ovinos (TABOSA *et al.*, 2004, SANTURIO *et al.*, 2007), humanos (IMWIDHAYA, 1994) e, provavelmente, asseguram a proliferação e sobrevivência de *Pythium insidiosum* nos tecidos do hospedeiro (MENDOZA *et al.*, 1992b; MENDOZA *et al.*, 2003).

O delineamento experimental *in vivo* para o tratamento dos coelhos com acetato de caspofungina foi baseado em estudos com animais que demonstraram a eficácia do fármaco no tratamento de candidíase e aspergilose disseminada (ABRUZZO *et al.*, 1997; PETRAITIENE *et al.*, 2002), histoplasmoses (GRAYBILL *et al.*, 1998) e coccidiodomicose (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). Embora o acetato de caspofungina deva ser administrado por via endovenosa, optou-se pela via intraperitoneal por questões práticas, porém fundamentadas em estudos *in vivo* que utilizaram esta via de administração (ABRUZZO *et al.*, 1997; GRAYBILL *et al.*, 1998; GONZÁLEZ *et al.*, 2001; VIANEN *et al.*, 2006). A administração de acetato de caspofungina por via intraperitoneal não contribuiu para a baixa eficácia do antifúngico na pitiose, uma vez que este fármaco

somente apresenta problemas de baixa disponibilidade quando administrado por via oral (LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003; MASCHMEYER & GLASMACHER, 2005; McCORMACK & PERRY, 2005). Estudos de farmacocinética em coelhos demonstram que o acetato de caspofungina na dosagem utilizada (1mg/kg/dia) atinge concentrações plasmáticas que excedem as CIMs reportadas para fungos oportunistas, ou seja, 1µg/mL (GROLL *et al.*, 2001), assim, problemas de eficácia devido a dosagem inadequada foram descartados. Entretanto, variações na eficácia do fármaco *in vivo*, de acordo com a dosagem utilizada, foram constatadas por González *et al.* (2001) em camundongos infectados com *Coccidioidis immitis* e por Vianen *et al.* (2006) em ratos neutropênicos com aspergilose pulmonar invasiva. Estes últimos autores observaram que o aumento na dosagem do acetato de caspofungina para 2, 3, ou 4 mg/kg/dia resultou em melhora da atividade terapêutica, com 100% de sobrevivência dos ratos quando utilizada a dosagem de 4 mg/kg/dia. Contrariando os resultados destes autores, Abruzzo *et al.* (1997), constataram a ineficácia do acetato de caspofungina em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* com CIMs entre 16-32 µg/mL, mesmo quando utilizaram doses acima de 20 mg/kg/dia. Desta forma, estudos futuros utilizando doses maiores do que 1mg/kg/dia do fármaco para o tratamento de pitiose experimental poderão evidenciar melhores resultados.

Salienta-se que, neste experimento, o protocolo de dosagem e o tempo de tratamento foram restritos, uma vez que uma das limitações encontradas no ensaio *in vivo* foi o elevado custo do acetato de caspofungina.

O fato do isolado utilizado para a inoculação dos animais apresentar CIM de 64 µg/mL pode ter afetado a eficácia do acetato de caspofungina no modelo animal. Variações nas respostas *in vivo* em decorrência da CIM foram observadas por Kohler *et al.* (2000) ao utilizar acetato de caspofungina para o tratamento de histoplasmose. Os autores constataram que o fármaco foi ineficaz, mesmo utilizando doses de 4 e 8 mg/kg/dia, e atribuíram essa resistência ao fato da amostra de *Histoplasma capsulatum* utilizada no experimento apresentar CIM de 8 mg/L. Em outro estudo, Graybill *et al.* (1998), utilizando um isolado de *Histoplasma capsulatum* com CIM de 0,25 mg/L, demonstraram significativo efeito na sobrevivência e carga fúngica nos tecidos com doses de acetato de caspofungina  $\geq 0,05$  mg/kg/dia. Esses dados sugerem a existência de variabilidade na eficácia *in vivo* do acetato de caspofungina em função da CIM do isolado. Portanto, novos estudos deverão ser realizados utilizando amostras de *Pythium insidiosum* com menores CIMs para comprovar essa provável variabilidade.

Ao avaliar-se a eficácia do acetato de caspofungina no modelo *in vivo*, constatou-se que as lesões dos coelhos tratados apresentaram redução da sua evolução durante o tratamento. Porém, quando a administração do fármaco foi suspensa, as mesmas retornaram a progredir, mas permaneceram menores ( $P < 0.05$ ) do que as lesões dos coelhos controle. A ausência de atividade fungicida sobre *Pythium insidiosum* observada no ensaio *in vivo* associada às altas CIMs do estudo *in vitro* indicam que este oomiceto é pouco suscetível ao acetato de caspofungina e sugerem a existência de correlação entre as CIMs e a resposta terapêutica. Entretanto, quando a eficácia deste fármaco foi comparada a imunoterapia, demonstrou-se que o antifúngico foi mais efetivo na contenção das lesões do que o imunoterápico, o que foi evidenciado pelo lento crescimento das lesões, mesmo após 12 semanas do término do tratamento; pela quantificação de hifas na coloração de Grocott e por não terem diferido significativamente do grupo tratado com o imunoterápico Pitium Vac<sup>®</sup>. Todavia, não se detectou cura pelo uso de acetato de caspofungina, o que já foi relatado com a utilização de Pitium Vac<sup>®</sup> em coelhos com pitiose experimental (SANTURIO *et al.*, 2003).

Os dados deste experimento somam-se a de outros estudos (MCMULLAN *et al.*, 1977; ENGLISH & FROST, 1984; DYKSTRA *et al.*, 1999; JAEGER *et al.*, 2002; GROOTERS, 2003; BOSCO *et al.*, 2005; RIVIERRE *et al.*, 2005; PUPAIBOOL *et al.*, 2006) que relatam a dificuldade de tratamento da pitiose com fármacos antifúngicos. Desta forma, ressalta-se que a falta de opções terapêuticas encoraja o uso e incrementa as pesquisas com imunoterapia para tratamento da pitiose em animais e humanos.

Cinco coelhos com pitiose experimental foram tratados com o imunoterápico Pitium Vac<sup>®</sup>, desenvolvido por Santurio *et al.* (2003). O método de preparação do imunoterápico utilizado por estes autores difere daqueles de Miller (1981) e Mendoza *et al.* (2003), pois utiliza o processo de maceração de hifas de *Pythium insidiosum*, seguido da extração dos antígenos através de éter sulfúrico e secagem por liofilização, o que aumentou a sua eficácia, comprovada em eqüinos naturalmente infectados por *Pythium insidiosum* no Brasil (MONTEIRO, 1999) e em coelhos com pitiose experimental (SANTURIO *et al.*, 2003).

No presente estudo, não foi observado cura clínica dos coelhos após oito doses de imunoterápico. Entretanto, foi evidenciado que as áreas de lesões subcutâneas apresentaram menor crescimento quando comparadas àquelas do grupo controle ( $P < 0.05$ ). Estes resultados diferem de Santurio *et al.* (2003), que relataram a cura de dois animais e a redução das áreas de lesões em 71,8% utilizando o mesmo número de doses



e a mesma formulação de imunoterápico. Estes autores também observaram que as áreas de lesões dos animais tratados evidenciaram redução após a 10<sup>a</sup> semana de tratamento (5<sup>a</sup> dose de imunoterápico). Contrariamente, neste experimento, as áreas de lesões dos animais tratados com Pitium Vac<sup>®</sup> regrediam até a 10<sup>a</sup> semana de tratamento, retornando a crescer até o final do período experimental. Somado a esses achados, a constante presença de reações de Splendore-Hoeppli nas lesões dos animais inoculados, sugerem que estas diferenças podem ter ocorrido, em razão da utilização de um isolado diferente daquele de Santurio *et al.* (2003).

Atribui-se que essa resposta possa estar relacionada a variações genéticas do isolado utilizado. Embora Mendoza *et al.* (1987) e Mendoza *et al.* (1992a) não tenham demonstrado diferenças entre isolados de *Pythium insidiosum* oriundos de diferentes origens geográficas, variações genéticas foram descritas por Schurcho *et al.* (2003a) e Schurcho *et al.* (2003b) ao avaliarem isolados de *Pythium insidiosum* provenientes das Américas, Ásia e Austrália. Mesmo que esses autores não tenham encontrado variabilidade genética entre isolados de uma mesma região geográfica, cabe salientar, que o isolado de *Pythium insidiosum* utilizado por Santurio *et al.* (2003) foi proveniente de um caso clínico de um equino no Estado do Rio Grande do Sul, enquanto que o isolado utilizado neste estudo foi oriundo de um equino com pitiose no Pantanal Mato-grossense. McMeekin & Mendoza (2000) ao verificarem o efeito de estreptomicina sobre o crescimento *in vitro* de diferentes isolados clínicos de *Pythium insidiosum*, observaram que alguns isolados eram estimulados enquanto outros eram inibidos, retratando possíveis variações genéticas e/ou fisiológicas do microrganismo. Portanto, estudos moleculares para comprovar a provável variabilidade genética deste isolado tornam-se necessários.

A variabilidade na imunogenicidade também pode ser acusada como provável causa dos resultados obtidos, uma vez que diferenças antigênicas entre isolados de *Pythium insidiosum* foram sugeridas por Leal *et al.* (2001a) ao observarem a ocorrência de casos atípicos de pitiose equina no Brasil. Similarmente, Krajaejun *et al.* (2006b), baseados no perfil sorológico de diferentes espécies com pitiose, afirmam que a resposta imune aos antígenos de *Pythium insidiosum* pode variar de hospedeiro para hospedeiro, assim como entre os isolados do patógeno. Diferentes antígenos imunodominantes têm sido identificados por Western Blot em estudos de avaliação do perfil protéico de soro de equinos com pitiose por Mendoza *et al.* (1992a) e Leal *et al.* (2005), em bovinos por Pérez *et al.* (2005) e Leal *et al.* (2005), em coelhos por Leal *et al.* (2005) e em humanos

por Vanittanakom *et al.* (2004) e Krajaejun *et al.* (2006b). Sendo assim, o perfil protéico desse isolado deverá ser esclarecido.

Alternativamente, esses resultados também podem estar associados ao status imunológico dos animais vacinados, uma vez que a eficácia do imunoterápico usado tem sido previamente comprovada por Monteiro (1999) e Santurio *et al.* (2003). Observações similares foram feitas por Miller (1981) e Mendoza *et al.* (1992b) ao avaliar a eficácia de seus imunoterápicos na cura da pitiose crônica em eqüinos. Esses autores atribuíram que a falha do imunoterápico nesses casos estava relacionada ao status imunológico dos animais, os quais foram considerados anérgicos. Além disso, Schurko *et al.* (2003a) sugerem que a ausência de resposta de alguns hospedeiros ao imunoterápico pode não depender, apenas, da resposta imunológica, mas também das características do isolado que está causando a doença.

Thitithanyanont *et al.* (1998), Mendoza *et al.* (2003) e Wanachiwanawin *et al.* (2004), afirmam que o mecanismo de cura obtido pelo imunoterápico envolve a mudança de uma resposta de linfócitos Th2 para uma resposta mediada por linfócitos Th1 evidenciada, principalmente, pela alteração dos padrões de interleucinas e lesões histopatológicas. Essa hipótese é fundamentada nos encontros de Miller (1981), Hensel *et al.* (2003) e Mendoza *et al.* (2003) que observaram que após imunoterapia a resposta eosinofílica desaparecia, sendo substituída por reação inflamatória mononuclear que desencadeia a destruição das hifas de *Pythium insidiosum*. A avaliação histológica das lesões subcutâneas dos coelhos controle e submetidos ao tratamento com Pitium Vac® e acetato de caspofungina, não apresentaram diferenças nos padrões histopatológicos. Por outro lado, a menor quantidade de hifas observada nas áreas necróticas dos coelhos tratados com Pitium Vac® sugerem que o imunoterápico foi capaz de estimular uma resposta imunológica que resultou na destruição de hifas de *Pythium insidiosum*. Similarmente, a menor quantidade de hifas também observadas nos coelhos tratados com acetato de caspofungina indica que este fármaco foi capaz de conter a infecção, porém não foi capaz de induzir a cura, comprovando a ausência de atividade fungicida sobre este microrganismo. Salienta-se que, embora, os coelhos tratados não tenham apresentado cura clínica, ambos os tratamentos foram eficazes em conter a progressão das lesões, uma vez que diferiram estatisticamente dos animais controle ( $P < 0.05$ ). No entanto, mesmo que não tenha sido observada diferença estatística entre os tratamentos avaliados, a imunoterapia continua sendo a melhor alternativa para o tratamento da pitiose em função de seu custo e possibilidade de cura, ainda que requeira maior tempo

de tratamento. A ausência de efeito fungicida do acetato de caspofungina sobre *Pythium insidiosum*, aliada ao seu elevado preço e ausência de cura, torna impraticável sua utilização no tratamento de pitiose em animais, especialmente na pitiose eqüina, espécie em que a enfermidade é mais freqüentemente observada.

Os resultados obtidos com este experimento enfatizam a importância do desenvolvimento, não somente de ensaios *in vitro*, mas também de ensaios *in vivo* em coelhos com pitiose experimental, nos estudos de suscetibilidade de *Pythium insidiosum* aos fármacos antifúngicos. Ao mesmo tempo em que veio corroborar com a problemática da terapia da pitiose, evidencia a necessidade da continuidade das pesquisas na busca de alternativas terapêuticas.

#### 4 CONCLUSÕES

1. A Norma M38-A: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos: Norma aprovada do NCCLS, deve ser adotada como metodologia padrão para a realização de testes de suscetibilidade de *Pythium insidiosum* aos fármacos antifúngicos;
2. As altas CIMs e a ausência de atividade fungicida do acetato de caspofungina sobre *Pythium insidiosum* indicam que este oomiceto é pouco suscetível a esse inibidor de  $\beta$ -glucanas da parede celular;
3. Os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* sugerem a existência de correlação entre as CIMs e a resposta terapêutica;
4. A imunoterapia continua sendo a melhor alternativa para o tratamento da pitiose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ALFARO, A.A. & MENDOZA, L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. **Equine Veterinary Journal**. v. 22, n. 4, p. 295-297, 1990.

ALLISON, N. & GILLIS, J.P. Enteric pythiosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 196, n. 3, p. 462-464, 1990.

ALVES, S.H. et al. Aplicação do “ELISA-conta” no diagnóstico da pitiose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 33, n. 3, p. 155-157, 2001.

ARGENTA, J.S. et al. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combination, against Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. doi: 10.1128/AAC.01075-0, 2007a.

ARGENTA, J.S. et al. Atividade *in vitro* e *in vivo* do itraconazol em combinação com terbinafina contra *Pythium insidiosum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5, 2007, Recife. **Anais...**, Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, 2007b, p. 264.

ARIKAN, S. et al. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 1, p. 327-330, 2001.

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

BADENOCH, P.R. et al. *Pythium insidiosum* keratitis confirmed by DNA sequence analysis. **British Journal Ophthalmology**. v. 85, p. 502-503, 2000.

BARTIZAL, K. et al. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK0991 (L-743,872). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 8, p. 2326-2332, 1997.

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

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

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

BOUZENZANA, J. et al. Identification of the first Oomycete annexin as a (1→3)-β-D-glucan synthase activator. **Molecular Microbiology**. v. 62, n. 2, p. 552-565, 2006.

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

BROWN, C.C. & ROBERTS, E.D. Intestinal pythiosis in a horse. **Australian Veterinary Journal**. v. 65, n. 3, p. 88-89, 1988.

BROWN, C.C. et al. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. **American Journal of Veterinary Research**. v. 49, n. 11, p. 1866-1868, 1988.

BUERGELT, C. et al. Abdominal pythiosis in a bengal tiger. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 37, n. 2, p. 186-189, 2006.

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

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

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

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

CHAIPRASERT, A. et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**. v. 33, n. 6, p. 317-323, 1990.

COLOMBO, A.L. & ALVES, S.H. Testes de Susceptibilidade a Antifúngicos. In: SIDRIM, J.J.C & ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. Cap. 10, p. 102-111.

CONNOLE, M.D. Equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 49, p. 214-215, 1973.

DALTO, A.G.C. et al. Pitiose intestinal em um equino no Rio Grande do Sul. **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**. v. 27, p. 131-133, 2007.

DAVIS, D.J. et al. Relationship between temperature optima and secreted protease activities on three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. **Mycological Research**. v. 110, p. 96-103, 2006.

DE COCK, A.W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.

DEL POETA, M.; SCHELL, W.A.; PERFECT, J.R. In vitro antifungal activity of Pneumocandin L-743,872 against a variety of clinical important molds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 8, p. 1835-1836, 1997.

DENNING, D.W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**. v. 362, p. 1142-1151, 2003.

DERESINSKI, S.C. & STEVENS, D.A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**. v. 36, p. 1445-1457, 2003.

DOUGLAS, C.M. Fungal  $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. **Medical Mycology**. v. 39, suppl. (1), p. 55-66, 2001.

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

EATON, S.A. Osseous involvement by *Pythium insidiosum*. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 15, p. 485-490, 1993.

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

ESPINEL-INGROFF, A. & KERKERING, T.M. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29, n. 2, p. 393-394, 1991.

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

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 10, p. 2950-2956, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Optimal Testing Conditions for Determining MICs and Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for Uncommon Molds: NCCLS Collaborative Study. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 10, p. 3776-3781, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to Caspofungin Acetate (MK-0091). **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 403-409, 2003.

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



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

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

FROMTLING et al. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 37, n. 1, p. 39-45, 1993.

GARCIA, R.B.; PASTOR, A.; MENDOZA, L. Mapping of *Pythium insidiosum* hyphal antigens and ultrastructural features using TEM. **Mycological Research**. v. 111, n. 11, p. 1352-1360, 2007.

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

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

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

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

GROLL, A.H. et al. Compartmental pharmacokinetics of the antifungal echinocandin caspofungin (MK-0991) in rabbits. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 2, p. 596-600, 2001.

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, n. 2, p. 147-152, 2002.

GROOTERS, A.M. et al. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 14, p. 288-294, 2002a

GROOTERS, A.M. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 16, n. 2, p. 142-146, 2002b.

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

GROOTERS, A.M. et al. Clinicopathologic findings associated with *Lagenidium* sp. infection in 6 dogs: Initial description of an emerging Oomycosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 17, p. 637-646, 2003.

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

HADJU, R. et al. Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agent MK-0991 (L-743,872). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 11, p. 2339-2344, 1997.

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

HELMAN, R.G. & OLIVER, J. Pythiosis of the digestive tract in dogs from Oklahoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 35, n. 2, p. 111-114, 1999.

HENSEL, P. et al. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 223, n. 2, p. 215-218, 2003.

HNILICA, K.A. Difficult dermatologic diagnosis. Pythiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 212, n. 8, p. 1192-1193, 1998.

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

HUBERT, J.D. & GROOTERS, A.M. Treatment of equine pythiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 24, n. 10, p. 812-815, 2002.

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

IMWIDTHAYA, P. & SRIMUANG, S. Immunodiffusion test for diagnosing human pythiosis. **Mycopathologia**. v. 106, p. 109-112, 1989.

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 Veterinary Internal Medicine**. v. 16, p. 598-602, 2002.

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

KAUFMAN, L.; MENDOZA, L.; STANDARD, P.G. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 28, n. 9, p.1887-1890, 1990.

KOHLER, S. et al. Comparison of the echinocandin caspofungin with amphotericin B for treatment of histoplasmosis following pulmonary challenge in a murine model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 7, p. 1850-1854, 2000.

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

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

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

KURTZ, M.B. et al. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)- $\beta$ -D-Glucan Synthase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.; v. 38, p. 1480-89, 1994

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

LARSSON, C.E. et al. Pitiose canina – Aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL e CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXV, XIII, II, 1997, Gramado. **Anais...**Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997, p. 155.

LEAL, A.T. et al. Pitiose eqüina com envolvimento de linfonodos. In: JORNADA DE PESQUISA, EXTENSÃO E ENSINO, IV, 1997, Santa Maria. **Anais ...**Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1997, p. 729.

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

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

LEAL, A.T. et al. Resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium insidiosum* associados a diferentes adjuvantes. **Ciência Rural**. v. 32, n. 6, p. 1027-1032, 2002.

LEAL, A.T. et al. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 15, p. 63-68, 2005.

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

LILJEBJELKE, K.A. et al. Duodenal obstruction caused by infection with *Pythium insidiosum* in a 12-week-old puppy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 220, n. 8, p. 1188-1191, 2002.

LITTLE, C.B. & KABAY, M.J. Fungal granuloma in a horse. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 298-300, 1984.

MACDONALD E. et al. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology**. v. 37, p. 245-249, 2002.

MASCHMEYER, G. & GLASMACHER, A. Pharmacological properties and clinical efficacy of a recently licensed systemic antifungal, caspofungin. **Mycoses**. v. 48, p. 227-234, 2005.

MCCORMACK, P.L. & PERRY, C.M. Caspofungin: A review of its use in the treatment of fungal infections. **Drugs**. v. 65, n. 14, p. 2049-2068, 2005.

MCMEEKIN, D. & MENDOZA, L. In vitro effect of streptomycin on clinical isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycologia**. v. 92, n. 3, p. 371-373, 2000.

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

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

MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; STANDARD, P.G. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 23, n. 5, p. 813-816, 1986.

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

MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; STANDARD, P.G. Antigenic relationship between animal and human pathogen *Pythium insidiosum* and nonpathogenic *Pythium* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 11, p. 2159-2162, 1987.

MENDOZA, L. Pitiosis: Una revisión. **Revista Ibérica de Micología**. v. 4, p. 159-175, 1987.

MENDOZA, L.; ALFARO, A.A.; VILLALOBOS, J. Bone lesions caused by *Pythium insidiosum* in a horse. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 26, p. 5-12, 1988.

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, n. 2, p. 73-77, 1989.

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

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

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

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

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.

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

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

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

MENDOZA, L. et al. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. **Mycopathologia**. v. 159, p. 219-222, 2005.

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, 1982a.

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

\_\_\_\_\_. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**. v. 21, p. 331-341, 1983a.

\_\_\_\_\_. Hematology of horses with phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 60, p. 28-29, 1983b.

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

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

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, n. 9, p. 984-986, 1985.

MILLER, R.I. Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 186, p. 473-478, 1985.

MONTEIRO, A.B. **Imunoterapia da pitiose eqüina: 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 – UFSM, Santa Maria, 1999.

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

MORAL, M.S. et al. Pitiose cutânea em eqüinos. **Saúde Eqüina**. p. 14-16, 1997.

MORTON, L.D. et al. Chronic eosinophilic enteritis attributed to *Pythium* sp. in a horse. **Veterinary Pathology**. v. 28, p. 542-544, 1991.

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

NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS document M38-A [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suíte 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NEWTON, J.C. & ROSS, P.S. Equine pythiosis: an overview of immunotherapy. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 15, n. 3, p. 491-493, 1993.

PAIVA, S. et al. Gastrite ulcerativa por *Pythium insidiosum* em cão: Relato de caso e confirmação diagnóstica por PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5, 2007, Recife. **Anais...Recife: Sociedade Brasileira de Micologia**, 2007, p.308.



PANNANUSORN, S. et al. Random amplified polymorphic DNA typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolates in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**. v. 38, n. 2. p. 383-391, 2007.

PATTON, C.S. et al. Esophagitis due to *Pythium insidiosum* infection in two dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 10, n. 3, p. 139-142, 1996.

PAVARINI, S.P. et al. Diagnóstico imunistoquímico de pitiose intestinal em um canino. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, XIII, 2007, Campo Grande. **Anais...**Campo Grande: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMS, 2007, p. 149-150. CD ROOM.

PECQUET-GOAD, M.E. Pulmonary pythiosis in a horse. **Veterinary Pathology**. v. 21, p. 261-262, 1984.

PEDROSO, P.M.O. et al. Diagnóstico histopatológico e imunoistoquímico de pitiose cutânea em eqüinos. **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**. v. 27, p. 107-109, 2007.

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

PETRAITIENE, R. et al. Antifungal efficacy of caspofungin (MK-0991) in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: Pharmacokinetics, drug disposition, and relationship to galactomannan antigenemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 1, p. 12-23, 2002.

PETRIKKOS, G. & SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 30, p. 108-117, 2007.

PFALLER, M.A. et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 26, n. 8, p. 1437-1441, 1988.

PFALLER, M.A. et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 34, n. 9, p. 1648-1654, 1990.

PFALLER, M.A. et al. In vitro activity of two Echinocandin derivatives, LY303366 and MK0991 (L-743,792), against clinical isolates of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, and other filamentous fungi. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**. v. 30, p. 251-255, 1998.

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

PRACHARKTAM, R. et al. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosus. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29, n. 11, p. 2661-2662, 1991.

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

PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis. **Emerging Infectious Disease**. v. 12, n. 3, p. 517-518, 2006.

PURCELL, K.L. et al. Jejunal obstruction caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 205, n. 2, p. 337-339, 1994.

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

RAVISHANKAR, J.P. et al. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 34, p. 161-175, 2001.

RECH, R.R.; GRAÇA, D.L.; BARROS, C.L.S. Pitiose em um cão: Relato de caso e diagnóstico diferenciais. **Clínica Veterinária**. v. 50, p. 68-72, 2004.

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

RIET-CORREA, F. et al. Pitiose em canino. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico-UFPEL**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 1998, 55 p.

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

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

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

ROMERO, M et al. Antifúngicos inibidores de la síntesis del glucano. **Revista Española de Quimioterapia**. v. 18, n. 4., p. 281-299, 2005.

ROSA, P.S., NEWTON, J.C., TRICHE, P. An ELISA teste to detect *Pythium insidiosum* infection in horses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XX, 1999, Salvador. **Anais...**Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p. 151.

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

SANAVRIA, A. et al. Pitiose em eqüinos: Relato de cinco casos no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 22, n. 4, p. 170-172, 2000.

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

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

SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiososi 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 insidiosus developed and evaluated. **Vaccine**. v. 21, p. 2535-2540, 2003.

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

SANTURIO, J.M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

SANTURIO, J.M. et al. Granulomatous rhinitis in sheep associated with *Pythium insidiosum* infection. **The Veterinary Record**. 2007. No prelo.

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

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

SCHURKO, A.M. et al. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycological Research**. v. 107, n. 5, p. 537-544, 2003b.

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

SEDRISH, S.A. et al. Adjunctive use of a neodymium:yttrium-aluminum garnet laser for treatment of pythiosis granulomas in two horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 211, n. 4, p. 464-465, 1997.

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

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

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

SILVA, S.M.M.S. et al. Conidiobolomycosis in sheep in Brazil. **Veterinary Pathology**. v. 44, p. 314-319, 2007.

SINGH, J.; RIMEK, D.; KAPPE, R. *In vitro* susceptibility of 15 strains of zygomycetes to nine antifungal agents as determined by the NCCLS M38-A microdilution method. **Mycoses**. v. 48, p. 246-250, 2005.

SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**. doi: 10.1080/13693780701513840, p. 1-12, 2007.

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

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

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

THOMAS, R & LEWIS, D. Pythiosis. **Selecciones Veterinarias**. v. 8, n. 3, p. 313-319, 1998.

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

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

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

VIANEN, W. et al. Caspofungin: antifungal activity *in vitro*, pharmacokinetics, and effects on fungal load and animal survival in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. **57**, p. 732-740, 2006.

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

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

WORSTER, A.A. et al. Pythiosis with bone lesions in a pregnant mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 216, n. 11, p. 1795-1798, 2000.