

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

***PYTHIUM INSIDIOSUM*: AVALIAÇÃO DE IMUNOTERÁPICO PARA
EQÜINOS, UTILIZANDO-SE COELHOS COMO MODELO
EXPERIMENTAL.**

Autor:

Méd. Vet. JANIO MORAIS SANTURIO

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
Micologia.

Orientador:

PROF. DR. LAERTE FERREIRO

PORTO ALEGRE

2004

Autor: Méd. Vet. JANIO MORAIS SANTURIO

Título: *PYTHIUM INSIDIOSUM*: AVALIAÇÃO DE IMUNOTERÁPICO PARA EQÜINOS, UTILIZANDO-SE COELHOS COMO MODELO EXPERIMENTAL.

Aprovada em 04 fevereiro de 2004

APROVADO POR:

Prof. Dr. LAERTE FERREIRO
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. DAVID DRIEMEIER
Membro da Comissão

Prof. Dr. MARIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES
Membro da Comissão

Prof. Dr. SYDNEY HARTZ ALVES
Membro da Comissão

S237p Santurio, Janio Morais

Pythium Insidiosum : avaliação de imunoterápico para eqüinos, utilizando-se coelhos como modelo experimental / Janio Morais Santurio ; orientador Laerte Ferreiro. – Porto Alegre, 2004.

71 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

1. Medicina veterinária 2. Medicina veterinária – Micologia 3. Micologia - Medicina veterinária 4. Medicina veterinária – Imunoterapia 5. Imunoterapia - Medicina veterinária 6. Pitiose – Imunoterapia 7. Pitiose – Imunoterápicos 8. Pitiose – Vacina 9. Vacina – Pitiose 10. Pythium insidiosum 11. Coelho - Animais para experiências 12. Animais para experiências – Coelho I. Ferreiro,, Laerte *orientador II. Título.

CDU : 619
619:616.99
619:57.084

DEDICATÓRIA

À Cléris, Deise e Roberta, principalmente pela compreensão.

AGRADECIMENTOS:

- A Deus pela vida e suas circunstâncias;
- Ao meu orientador, colega e amigo Prof. Laerte Ferreira, pela ajuda e compreensão em todos os momentos;
- Aos Colegas Alexandre e Adriana Leal pela paciência e auxílio no desenvolvimento experimental deste trabalho;
- Ao Colega Prof. Sydney Hartz Alves pela colaboração nas aulas na graduação e pelo apoio nos momentos difíceis;
- À Colega Prof^a. Agueda Castagna de Vargas por ter assumido as minhas tarefas de docência durante meu afastamento;
- À Colega Prof^a Maristela Lovato Flores pelo auxílio decisivo nas aulas da graduação;
- À Prof^a. Virginia Peretti Torelly pelo auxílio nas traduções para a língua inglesa;
- Aos alunos bolsistas do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, pela amizade e ajuda.

RESUMO:

A pitiose é uma doença granulomatosa, tendo como agente etiológico *Pythium insidiosum* De Cock, 1987, que atinge eqüinos, provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo, caninos com apresentação gastrointestinal e cutânea, bovinos com doença cutânea, felinos e humanos, com quadro clínico de arterite, queratite e celulite periorbital. Esta enfermidade é mais prevalente em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas. Também animais silvestres podem se infectar pela doença. O gênero *Pythium* pertence ao Reino *Stramenopila*, Filo *Oomycota*, cujos membros caracterizam-se por produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada. O desenvolvimento de pitiose experimental nas espécies naturalmente infectadas não foi ainda relatado, mas os coelhos são sensíveis à inoculação de zoósporos e podem ser usados como modelo experimental para estudo da pitiose. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de 3 processos de produção de imunoterápicos contra pitiose, produzidos a partir do cultivo e posterior maceração ou sonicação, em coelhos infectados experimentalmente com 17.500 zoósporos do oomiceto *Pythium insidiosum* (cepa CBS 101555). Todos os coelhos foram inoculados com zoósporos 1 mês antes da aplicação dos imunoterápicos. Para avaliação dos imunoterápicos, os coelhos que desenvolveram lesões foram divididos em 4 grupos de 5 animais: Grupo 1 – Tratado com placebo; grupo 2 – tratado com o imunoterápico sonicado; grupo 3 – tratado com o imunoterápico misto e o grupo 4 - Imunoterápico macerado mecanicamente. Todos os animais receberam 8 doses do imunoterápico ou placebo com intervalos de 14 dias. Um mês após a inoculação dos zoósporos móveis, foram iniciadas as medições das áreas inoculadas. Os resultados indicaram que o imunoterápico macerado, utilizado no grupo 4, foi estatisticamente ($P < 0.001$) mais eficiente que os demais, diminuindo em até 71,8% a área dos nódulos provocados pelo *Pythium insidiosum*, após 26 semanas de avaliação. Neste período 2 coelhos deste grupo foram curados. Os animais do Grupo 2 que receberam o imunoterápico sonicado, não mostraram nenhuma reação, detectando-se aumento de até 221% no tamanho das lesões. Nos coelhos do grupo 3, imunoterápico misto, houve aumento das lesões em 50%. A provável causa deste insucesso com o grupo 2, está na desnaturação dos antígenos protetores através dos processos de sonicação. Os dados gerados nesta tese podem inferir que, futuramente, novas perspectivas se abrem para o estudo da pitiose e seu controle.

Palavras-chave: : *Pythium insidiosum*, pitiose, fungo, coelho, imunoterapia, zoósporo, Oomycota

ABSTRACT:

*The pythiosis is a granulomatous disease, tends as aetiologic agent *Pythium insidiosum* De Cock, 1987, that reaches equine and provoking infectious picture in the skin and subcutaneous area, canine with gastrointestinal and cutaneous presentation; bovine with cutaneous disease, felines and human, with arteritis, queratitis and periorbital cellulitis. Pythiosis happening in tropical, subtropical or temperate areas of the world. Wild animals can also be infected by the disease. The genera *Pythium* belongs to the Kingdom Stramenopila, Phylum Oomycota, whose members are characterized by production of biflagelated zoospores during the anamorphic reproduction. Experimental models of pythiosis in naturally infected species have not yet been reported but, rabbits may be inoculated with zoospores as an experimental model for studying the disease. The present study evaluates the efficacy of three different of immunotherapies in the rabbit model. Approximately 17,500 zoospores of oomycete *Pythium insidiosum* (CBS 101555 strain) were inoculated in each animal to generate the disease. Immunotherapies were produced from vortexed or sonicated cultures of the same strain. Four groups of 5 animals were employed: Group 1 = Placebo, Group 2= Sonicated Immunotherapeutic, Group 3= Mixed Immunotherapeutic, Group 4= Vortexed Immunotherapeutic. All rabbits were inoculated with viable zoospores one month before administration of the immunotherapies. Eight doses of immunotherapeutic or placebo were used in each animal with a 14 day interval between injections. Rabbits receiving the vortexed immunotherapeutic were most effectively protected, ($P < 0.05$) showing a decrease in the area of costal nodules due to *Pythiosis insidiosi* by 71.8% after 26 weeks of evaluation. Moreover, two animals in this group showed complete remission of the infection at the end of the 26 weeks. In contrast to these findings, rabbits given the sonicated immunotherapeutic did not show any protection and had an increase of 211.8% in the size of lesions. This failure of sonicated immunotherapeutic may reflect denaturation of protective antigens due to the sonication method. The data generated in this thesis permits infer that, hereafter, new open up perspectives for the study of the pythiosis and its control.*

*Keywords: Pythiosis, *Pythium insidiosum*, Rabbit; Zoospores, Immunotherapy Oomycota;*

SUMÁRIO:

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS:	V
RESUMO:	VI
<i>ABSTRACT</i> :	VIII
INTRODUÇÃO:	11
Objetivos:	13
1.1 Objetivo geral:.....	13
1.2 Objetivos Específicos:.....	14
REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 Histórico e Taxonomia.....	15
1.2 <i>Pythium insidiosum</i>	17
1.3 Epidemiologia	19
1.4 PITIOSE.....	22
1.4.1 Eqüinos.....	22
1.4.2 Cães e Gatos	25
1.4.3 Bovinos	27
1.4.4 Humanos	28
1.4.5 Coelhos.....	29
1.5 Histopatologia	31
1.6 Diagnóstico.....	31
1.7 Tratamento.....	35
1.8 Imunoterapia.....	38
ARTIGO PUBLICADO:.....	44
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÕES:	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS	69

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Imunoterápico contra pitiose nos eqüinos “PitiumVac”	13
Figura 2: Esporângio lobulado de <i>Pythium insidiosum</i> , cepa CBS 101555.....	18
Figura 3: Fenograma UPGMA apresentando as interrelações entre isolados de <i>P. insidiosum</i>	19
Figura 4: Eqüinos em seu habitat no pantanal matogrossense.....	20
Figura 5: Esquema do ciclo biológico do <i>Pythium insidiosum</i>	21
Figura 6. Eqüino do pantanal com pitiose clássica na pata em processo de auto mutilação	24
Figura 7: Lesão atípica de pitiose no pantanal brasileiro	24
Figura.8: Colite infecciosa de um cão com pitiose..	27
Figura 9: Bovinos da raça nelore de 6 meses de idade com lesão de pitiose	28
Figura 10: Fibrogranuloma em coelho após 30 dias de inoculação com 17.500/mL zoósporos de <i>Pythium insidiosum</i>	30
Figura 11 : Coelho com fibrogranuloma supurado após 60 dias da inoculação com 17.500 zoósporos/mL de <i>Pythium insidiosum</i>	30
Figura 12: Cultivo de <i>P. insidiosum</i> em caldo sabouraud a 37°C.....	34
Figura 13: Hifas de <i>Pythium insidiosum</i> em cultivo em ágar farinha de milho	34
Figura 14: Cultivo de isolado de <i>P. insidiosum</i> , para produção indução de zoosporangênese.	35
Figura 15: Hipótese proposta para os efeitos curativos dos imunoterápicos contra pitiose baseado em dados de humanos e eqüinos.....	41
Figura 16: Eqüino com pitiose clínica na pata (A) e o mesmo animal totalmente curado (B) após receber 4 doses do imunoterápico PitiumVac.....	43

Pythium insidiosum: avaliação de imunoterápico para eqüinos, utilizando-se coelhos como modelo experimental.

INTRODUÇÃO:

A pitiose é uma doença granulomatosa que atinge eqüinos, provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo, caninos com apresentação gastrintestinal e cutânea, bovinos com doença cutânea, felinos e humanos apresentando quadro clínico de arterite, queratite e celulite periorbital. É mais prevalente em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas (MEIRELES *et al.*, 1993; MENDOZA *et al.*, 1996; SANTURIO *et al.* 1998; GROOTERS, 2003). É causada pelo oomiceto pertencente ao Reino *Stramenopila*, *Pythium insidiosum* (DE COCK *et al.*, 1987, ALEXOPOULUS, 1996). Nas espécies não domésticas, o *Pythium insidiosum* foi reconhecido como causa de doença pulmonar primária num jaguar (*Pantera onca*) da América Central, além de lesões cutâneas e gastrintestinais em um urso de zoológico e, também, como causa de lesão mandibular subcutânea em um camelo (GROOTERS, 2003).

A enfermidade nos eqüinos caracteriza-se pela formação de granulomas com infiltrações de eosinófilos, com a presença de massas necróticas denominadas de “kunkers” (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES *et al.*, 1993; SANTURIO *et al.*; 2003).

Os caninos são a segunda espécie mais atingida e as infecções caracterizam-se pela formação de piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (MILLER *et al.*, 1983; FOIL *et al.*, 1984; BENTINCK-SMITH *et al.*, 1989; HOWERTH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; GROOTERS, 2003). Em humanos, a doença é comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia. A doença apresenta-se nas formas subcutânea, sistêmica e oftálmica, sendo que as formas cutâneas e sistêmicas estão associadas à síndrome de α e β -talassemia, comuns nessa região (IMWIDTHAYA, 1994a; IMWIDTHAYA, 1995).

Diversos protocolos para o tratamento da pitiose têm sido utilizados, principalmente em eqüinos, incluindo tratamento químico (antifúngicos), cirúrgico e de imunoterapia . A imunoterapia, proposta inicialmente por MILLER (1981), surgiu como

uma alternativa concreta para o controle da doença e tem apresentado resultados animadores (MONTEIRO, 1999; MENDOZA *et al.*2003).

O coelho é o único animal no qual se conseguiu reproduzir a pitiose cutânea a partir da inoculação de zoósporos produzidos por zoosporangênese em laboratório (MILLER & CAMPBELL, 1983b). Passa, então, esta espécie animal a ser modelo natural para testes com drogas e imunoterapia contra a pitiose.

Desde 1993, o Laboratório de Pesquisas Micológicas da Universidade Federal de Santa Maria [LAPEMI] vem utilizando um imunoterápico (IMT) contra a pitiose em eqüinos, desenvolvido em conjunto com a Embrapa Pantanal. Este IMT, com o nome de PitiumVac foi registrado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), visando a obtenção de patente de invenção para a UFSM e EMBRAPA. Também este IMT está em processo de registro junto ao Ministério da Agricultura.

O IMT PitiumVac mostrou-se eficiente para eqüinos com pitiose clínica, porém, na tentativa de seu aperfeiçoamento, substituindo-se o processo de maceração das hifas, pelo processo de sonicação, empregando-se um disruptor de células. Observou-se que este IMT perdeu sua eficiência em mais de 70% dos eqüinos tratados (OBSERVAÇÕES PESSOAIS). Diante disso procurou-se investigar se as causas do baixo desempenho do PitiumVac (figura 1 e anexo 2) estavam na liberação dos antígenos, desnaturação destes ou em seu processo de liofilização. Para tal, foram propostos 3 processos de preparo do IMT os quais foram testados em coelhos infectados experimentalmente.



Figura 1: Imunoterápico contra pitiose nos eqüinos “PitiumVac” com registro de invenção pertencente ao LAPEMI/UFSM e EMBRAPA (anexo 3).

Objetivos:

Este estudo foi objetivado a:

1.1 Objetivo geral:

Avaliar, na pitiose experimental em coelhos os imunoterápicos obtidos a partir de 3 diferentes protocolos fundamentados na: a)sonicação das hifas de *P. insidiosum* (cepa DMVP118/98 – CBS 105555 – anexo b)liquidificação ou maceraçãomecânica das hifas c) imunoterápico misto, produzido com 50% de sonição e 50% de maceração, comparando-os a um grupo controle tratado com placebo.

1.2 *Objetivos Específicos:*

1.2.1. Comparar a atividade dos diferentes imunoterápicos, através de medidas da involução dos fibrogranulomas da pitiose experimental em coelhos, após aplicação de 8 doses.

1.2.2. Avaliar, microscopicamente, as alterações histopatológicas da pitiose experimental em coelhos, após a aplicação dos diferentes imunoterápicos.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Histórico e Taxonomia

O agente da pitiose - *Pythium insidiosum* – é, atualmente, classificado como um organismo zoospórico, habitante de solo e de água. São conhecidas muitas espécies de *Pythium* como patógeno de plantas importantes economicamente, mas *P. insidiosum* é o único, dentro deste gênero, reconhecido como patógeno para mamíferos. Manifestações clínicas de pitiose foram, pela primeira vez, diagnosticadas na Índia na metade do século 19, por veterinários ingleses. Eles observaram doença granulomatosa cutânea crônica que denominaram “bursattee” (GROOTERS, 2003). No final do século XIX, a etiologia fúngica, baseada em dados histopatológicos, foi proposta pelos investigadores SMITH, (1884) e DROUIN, (1896). O primeiro isolamento desse organismo filamentosos foi realizado, no início do século XX, por DE HAAN & HOOBKAMER (1901), a partir de granulomas subcutâneos em eqüinos na Indonésia, Estes autores o classificaram como sendo um fungo zigomiceto ou ficomiceto baseados apenas nas características morfológicas da hifa vegetativa. Propuseram, também, o nome “hyphomycoses destruens” para a doença, porém não conseguiram classificar o agente etiológico. Somente em 1961 foi possível o isolamento e identificação do agente, o qual recebeu o nome de *Hyphomyces destruens*, baseado no nome da doença sugerido anteriormente (BRIDGES & EMMONS, 1961). Em 1964, EMMONS sugeriu o termo ficomicoses para designar as micoses (humanas e animais) causadas por fungos com hifas grandes e poucos septos, incluindo os gêneros *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Basiodobolus*, *Entomophthora*, *Hyphomyces* e *Mortierella*. Em 1974, foi possível o isolamento e a caracterização mais detalhada do agente etiológico a partir de eqüinos infectados, quando, então, foi observada a sua capacidade de produzir zoósporos biflagelados a partir de isolados de eqüinos originários da Nova Guiné. Baseados nessa característica, AUSTWICK & COPLAND, (1974) classificaram o *H. destruens* como um fungo da família *Pythiaceae*, ordem *Peronosporales* e que deveria ser incluído no gênero *Pythium*. No entanto, a denominação *Hyphomyces destruens* continuou sendo

utilizada nas descrições da doença (McMULLAN *et al.*, 1977; MURRAY *et al.*, 1978; GONZÁLEZ *et al.*, 1979).

Em 1980, ICHITANI & AMEMIYA compararam um isolado de equino com outras espécies de *Pythium*, através de suas características reprodutivas (oogônia e zoósporos), identificando o agente como *Pythium gracile* Middleton, 1943. Somente em 1987, DE COCK *et al.* ao analisarem isolados de equinos, bovinos, cães e humanos, oriundos de diferentes locais, concluíram que tratava-se do mesmo organismo, que foi denominado *Pythium insidiosum*. Nesse mesmo estudo, concluiu-se que essa nova espécie era igual às anteriormente descritas, *Pythium sp* -Austwick e Copland; *Pythium gracile* – Ichitani e Amemiya; e *Hyphomyces destruens* – Bridges e Emmons. Também em 1987, Shipton (apud MENDOZA & MARIN, 1989) analisou um isolado de equino da Austrália e classificou-o como uma nova espécie: *Pythium destruens*. No entanto, em 1989, provas sorológicas realizadas com anti-soro produzido em coelhos e soro de equinos infectados, frente a antígenos de *P. insidiosum* (De Cock) e *P. destruens* (Shipton), demonstraram o mesmo perfil antigênico e estabeleceu-se a nomenclatura definitiva para o agente etiológico da pitiose: *Pythium insidiosum* (MENDOZA & MARIN, 1989).

Embora o nome do agente tenha sido estabelecido, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes. Segundo DE COCK *et al.* (1987), os oomicetos são seres eucariotas produtores de zoósporos biflagelos, característica comum ao *Pythium insidiosum*, incluindo-o na ordem *Peronosporales*, filo *Oomycota* e reino *Protista*. MENDOZA *et al.* (1996), baseados em um estudo de CORLISS (1994) sobre a classificação e características dos Protistas, apresentaram o *P. insidiosum* como um organismo do reino *Chromista*, filo *Pseudo-fungi*, classe *Oomycetes*, ordem *Pythiales*, e família *Pythiaceae*. Entretanto, estudos detalhados sobre a classificação dos fungos, baseados em sistemática filogenética e análises moleculares, entre outros, dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: *Fungi*, *Stramenopila* e *Protista* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Baseado nessa nova classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao Reino *Stramenopila*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* e espécie *P. insidiosum* (MONTEIRO, 1999; LEAL, 1999). Estudos taxonômicos mais aprofundados, baseados em análises de sequenciamento de gene do RNA ribossomal de *P. insidiosum*, confirmaram que os membros da classe *Oomycetes* são filogeneticamente distantes dos membros do Reino *Fungi* e estariam relacionados de maneira mais

próxima das algas que dos fungos (KWON-CHUNG , 1994). A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos estão retratados ao nível celular através de diferenças na parede e composição da membrana. A quitina, um componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, onde aparecem como componentes predominantes celulose e β -glucana (HENDRIX, 1964). Também os oomicetos diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, nos primeiros ele não é o principal esteróide . Nenhum dos oomicetos compartilham da mesma bioquímica dos esteróides como os fungos. Espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium*, e *Phytophthora* possuem esteróides auxotróficos, ou seja, eles incorporam os esteróides do ambiente em lugar de os produzirem como ocorre com os fungos. Os esteróides são importantes para produção de estruturas sexuadas *in vitro*, mas não são necessários para o crescimento da hifa vegetativa (GROOTERS, 2003).

1.2 *Pythium insidiosum*

O gênero *Pythium* pertence ao filo *Oomycota*, cujos membros caracterizam-se por: 1) produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada); 2) reprodução sexuada oogâmica; 3) parede celular composta de β -glucanas, celulose e hidroxipolina; 4) talo diplóide; 5) mitocôndria com crista tubular; 6) características moleculares e bioquímicas peculiares, como uma rota alternativa para síntese do aminoácido lisina (MOORE-LANDECKER, 1996; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Esse gênero possui mais de 120 espécies distribuídas em todo planeta, sendo a maioria habitantes do solo e patógenos de plantas. Espécies de *Pythium* são a principal causa da doença “damping-off” de plantas, ocasionando severos prejuízos em lavouras. Algumas espécies tem sido estudadas para utilização como controle biológico de fungos patógenos e larvas de mosquito, enquanto apenas a espécie *P. insidiosum* é conhecida como patógeno de mamíferos. A identificação das espécies de *Pythium* não é uma tarefa fácil, pois está baseada principalmente nas características morfológicas dos zoosporângios (figura 2), zoósporos, oogônia e anterídio (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; MOORE-LANDECKER, 1996).



Figura 2: Esporângio lobulado de *Pythium insidiosum*, cepa CBS 101555, produzido em meio de indução sobre folhas da grama *Paspalum notatum*. Este esporângio está em estágio intermediário e tem 6 minutos de desenvolvimento (400x). [Foto LAPEMI].

SCHURKO *et al.* (2003), ao compararem 28 espécies de *P. insidiosum* originárias das Américas, Ásia e Austrália, através de comparação do espaço ribossomal intergênico pela técnica molecular de RFLP (“restriction fragment-length polymorphism”) e análise dos “clusters” (figura 3), demonstraram haver grandes diferenças entre os isolados de *P. insidiosum* das 3 regiões estudadas (figura 3) com a possibilidade real de não serem todas a mesma espécie. Estes autores levantam a possibilidade de uma reclassificação como sub-espécies, pois cada cluster dos isolados representa populações geneticamente distintas.

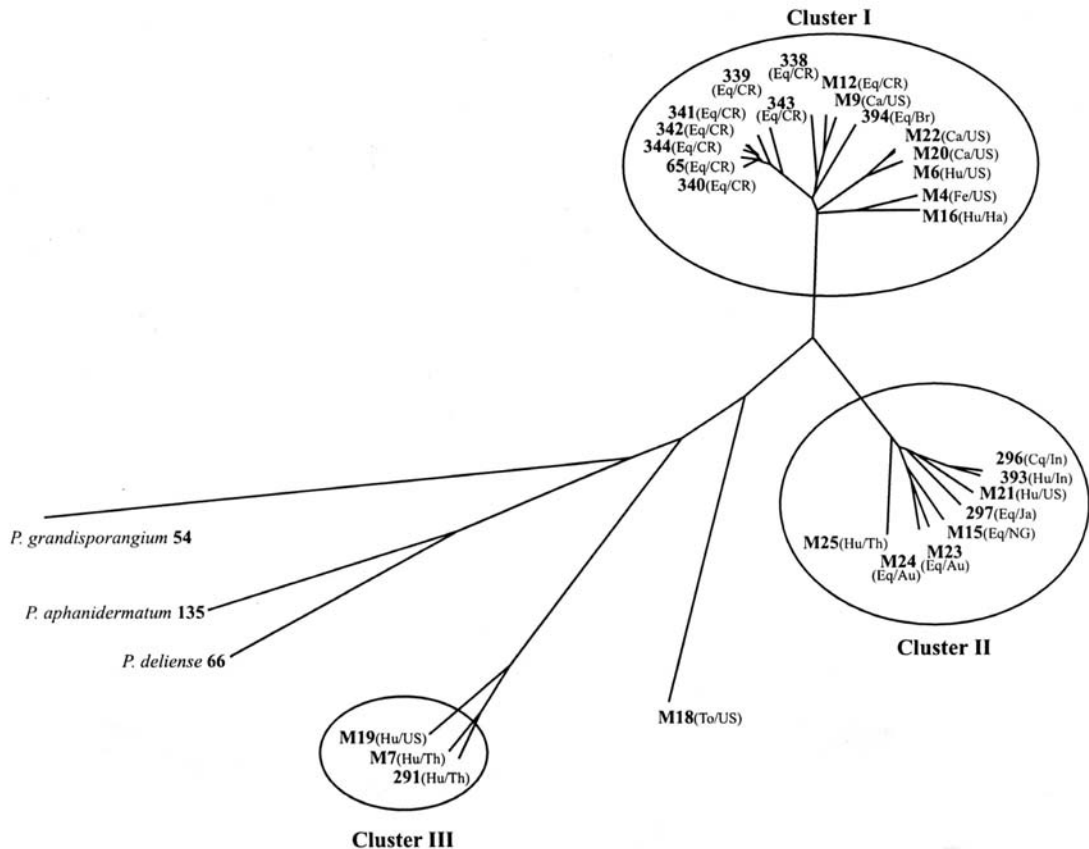


Figura 3: Fenograma UPGMA apresentando as interrelações entre isolados de *P. insidiosum*. O hospedeiro e o país de origem estão indicados entre parênteses (hospedeiro/País) com as seguintes abreviações : Hospedeiro – Ca, canino; Cq, *Culex quinquefasciatus* larva; Eq, eqüino; Hu, humano; To, *Tremarctos ornatus* (spectacled bear); País – AU, Austrália; BR, Brasil; CR, Costa Rica; HA, Haiti; IN, Índia; JA, Japão; NG, Nova Guiné; TH, Tailândia; US, Estados Unidos. (SCHURKO *et al.*, 2003)

1.3 Epidemiologia

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, tendo sido relatada nas Américas, alguns países europeus, sudeste asiático e Oceania (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996; MENDOZA *et al.*, 1996). Não há predisposição por sexo, idade ou raça e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e homens (MENDOZA *et al.*, 1996).

As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema. Segundo MILLER & CAMPBELL (1982a), para a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e o acúmulo de água em banhados e lagoas (figura 4). A grande maioria dos casos de pitiose foram

observados durante ou após a estação chuvosa. Baseados nos dados epidemiológicos, os autores acreditam na existência de um período de incubação de várias semanas. No Pantanal brasileiro, a maioria dos casos de pitiose eqüina são registrados entre os meses de fevereiro e maio (verão-outono), período que corresponde ao ápice das cheias (LEAL *et al.*, 2001). Grande parte dos 38 casos de pitiose observados por TABOSA *et al.* (1999) na Paraíba, foram registrados nos meses de julho a outubro, sete a dez meses após o início das chuvas na região.



Figura 4: Eqüinos em seu habitat no pantanal matogrossense. Destaca-se a maciça proliferação de plantas aquáticas onde se reproduz o *P. insidiosum*. (Foto SANTURIO et al. 2003)

Em 1983, MILLER propôs um ciclo ecológico para descrever o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa desse organismo. O ciclo baseia-se na colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo, formando os zoosporângios. Os zoósporos livres na água, movimentam-se até encontrar outra planta (ou animal), onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo (figura5). Análises *in vitro* demonstraram a atração dos zoósporos por pêlos, tecidos animal e tecido vegetal, sendo a quimiotaxia atribuída a algumas substâncias presentes nesses tecidos. Uma substância amorfa é liberada pelo zoósporo após o seu encistamento, a qual provavelmente é produzida em resposta ao fator quimiotáxico do hospedeiro; essa substância agiria como

um adesivo para ligar o zoósporo a superfície do hospedeiro e permitir a formação de tubo germinativo (MENDOZA *et al.*, 1993).

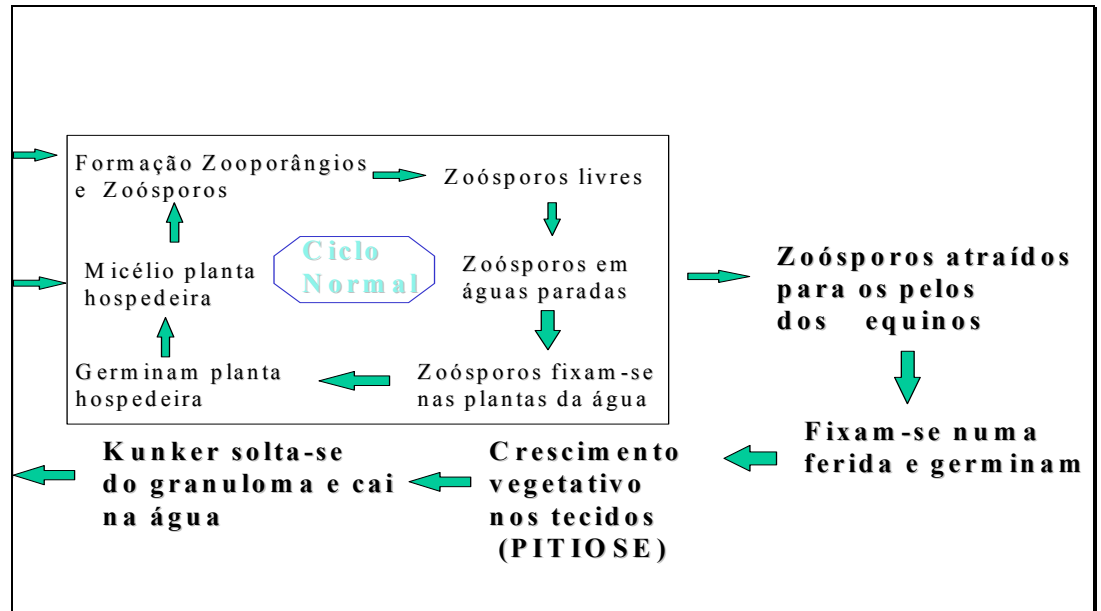


Figura 5: Esquema do ciclo biológico do *Pythium insidiosum* adaptado de MILLER (1983).

Essas observações sustentaram a teoria de infecção, sugerindo que os cavalos em contato com águas contaminadas poderiam atrair os zoósporos, os quais germinariam a partir de uma pequena lesão cutânea (MILLER, 1983; MENDOZA *et al.*, 1993). Outros autores sugeriram a 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 do quimiotaxismo ser mais ativo na região localizada dentro do folículo piloso (SANTURIO *et al.*, 1998). Essa observação pode questionar a necessidade de lesão na pele para que ocorra a germinação dos zoósporos. Por outro lado, nos casos e relatos acompanhados no Brasil, foi possível detectar diferenças na suscetibilidade de equinos à infecção. Comparando-se com os dados de pitiose humana, onde a maior parte dos casos ocorrem em indivíduos talassêmicos, pode-se suspeitar da presença de alguma(s) característica(s) que torne alguns animais mais suscetíveis. São necessárias mais investigações nesse sentido (SANTURIO *et al.*, 2003).

No Brasil, a pitiose foi descrita em eqüinos, bovinos e caninos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em eqüinos. O primeiro relato ocorreu no Rio Grande do Sul, por SANTOS & LONDERO (1974). Os relatos de

pitiose eqüina no Brasil somam mais de 90 casos e foram descritos em vários estados como Rio Grande do Sul (SANTOS, *et al.*, 1987; MEIRELES *et al.* 1993, SALLIS *et al.*, 2003), Mato Grosso do Sul (MONTEIRO, 1999; LEAL *et al.*, 2001), São Paulo (RODRIGUES & LUVIZOTTO, 2000), Pará (TÚRY & CORÔA, 1997), Paraíba (TABOSA *et al.* 1999), Paraná (HEADLEY & ARRUDA Jr, 2004) e Rio de Janeiro (SANAVRIA *et al.*, 2000). Além dos casos descritos na literatura, existem informações de médicos veterinários de várias regiões do país, demonstrando a presença da doença em vários estados. Esses relatos comprovam a provável existência da pitiose equina em todo o País. Além disso, o Pantanal brasileiro é provavelmente o local de maior incidência e prevalência de pitiose eqüina do mundo (MENDOZA *et al.*, 1996, LEAL *et al.*, 2001; SANTURIO *et al.*, 2003). O Pantanal é uma planície inundável de aproximadamente 140.000 km² e possui em torno de 139.760 eqüinos (SILVA *et al.*, 1995). Embora não exista um levantamento preciso da incidência no Brasil, a pitiose equina representa um problema à criação de eqüinos, especialmente em regiões alagadiças como no pantanal brasileiro.

1.4 PITIOSE

1.4.1 Eqüinos

A doença é conhecida por outros nomes como hifomicose, zigomicose, dermatite granular, “bursattee”, “Florida leeches”, granuloma ficomicótico e “swamp cancer” (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996); nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul o nome popular mais conhecido é “ferida da moda” (LEAL *et al.*, 2001). O termo hifomicose inclui outras doenças causados por fungos, especialmente *Conidiobolus ranarum* e *Basidiobolus haptosporum*, além de membros da ordem *Mucorales* (BROWN & ROBERTS, 1988).

A espécie eqüina é a mais atingida pela pitiose, não havendo predisposição de raça, sexo ou idade (MENDOZA & ALFARO, 1986; FOIL, 1996). As lesões cutâneas são as mais freqüentes e atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toraco-abdominal, provavelmente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos (MILLER & CAMPBELL, 1982a; CHAFFIN *et al.*, 1995). O zoósporo de *P. insidiosum* em contato com uma ferida, produz tubo germinativo com secreção de enzimas proteolíticas que penetram

ativamente no tecidos exercendo pressão de $0,14\mu\text{N } \mu\text{m}^{-2}$ sobre eles para sua penetração (RAVISHANKAR *et al.*, 2001; MACDONALD *et al.*, 2002). Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando grandes massas teciduais (5 a 500mm), com bordas irregulares, de aparência tumoral e com hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas semelhante a corais, chamadas internacionalmente de ““kunkers””. Os “kunkers” variam de 2 a 10 mm de diâmetro, tem forma irregular, ramificada, com aspecto arenoso e penetram no tecido granular, dentro de *sinus* formados ao longo do seu trajeto. O tamanho das lesões depende do local e duração da infecção e, apresentam secreção sero-sanguinolenta, muco-sanguinolenta, hemorrágica e, às vezes, mucopurulenta que flui através dos *sinus*. Os animais apresentam intenso prurido e normalmente mutilam a lesão na tentativa de aliviar o desconforto (Figura 6). Claudicação é freqüente nos cavalos atingidos nos membros (MILLER & CAMPBELL, 1982a; MEIRELES *et al.*, 1993; CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDOZA *et al.*, 1996; LEAL *et al.*, 2001). A maioria dos casos descritos relata apenas uma lesão em cada animal, porém podem existir lesões cutâneas multifocais, como as descritas por MILLER & CAMPBELL (1982a), MENDOZA & ALFARO (1986) e CHAFFIN *et al.* (1992). Também a pitiose pode se disseminar para órgãos internos a partir de infecções sub-cutâneas (REIS *et al.*, 2003). Esses autores detectaram infecção generalizada em 3 equinos no estado de Minas Gerais, principalmente pulmões e fígado, sendo o achado de hifas confirmado através de PCR do DNA ribossomal como *P. insidiosum*. Em 2001, LEAL *et al.*, relatam casos atípicos de pitiose eqüina no pantanal brasileiro. Os animais mostram lesões deformantes mas, de forma diversa, não ocorre a saída constante de linfa e outros fluídos corporais e o tecido granulomatoso é recoberto com pele escurecida e grossa (figura 7). Ao ser pressionada a lesão, facilmente consegue-se extrair “kunkers” com facilidade de onde foram isoladas estruturas posteriormente identificadas como *Pyhium insidiosum*. Os eqüinos com tais lesões atípicas de pitiose não apresentam emagrecimento progressivo e, após um ano de observação as lesões permanecem do mesmo aspecto e tamanho. Segundo Leal *et al.* (2001), somente no pantanal brasileiro são registradas estas formas bizarras da pitiose nos eqüinos.



Figura 6. Eqüino do pantanal com pitiose clássica na pata em processo de auto mutilação . Os eqüinos com pitiose apresentam intenso prurido no local da lesão.(Foto LAPEMI)



Figura 7: Lesão atípica de pitiose no pantanal brasileiro descrita por LEAL *et al.* (2001). Observa-se lesão não supurativa, recoberta com pele escura e, sob pressão, saem com facilidade “kunkers”. (Foto LAPEMI)

O envolvimento intestinal é a segunda forma mais freqüente da infecção pelo *Pythium insidiosum* em eqüinos. Os casos descritos apresentaram-se como episódios de cólica, cuja causa é a presença de massas teciduais, com diminuição e obstrução do lúmen intestinal ou ambos. Os achados de necropsia e excisão cirúrgica revelaram

ulceração intestinal e massas nodulares localizadas na parede do jejuno, podendo atingir 20cm de diâmetro (SANTURIO *et al.*, 2003).

Além da pitiose cutânea e intestinal, outros órgãos e tecidos podem ser atingidos secundariamente às lesões cutâneas. As lesões ósseas descritas na literatura referem-se a cavalos com lesões cutâneas crônicas, localizadas nos membros e com grande proliferação do tecido granulomatoso. Estas lesões ósseas ficaram limitadas aos ossos adjacentes às lesões cutâneas crônicas e, caracterizaram-se por exostoses, osteólises e osteomielite no exame radiológico além da presença de granulomas com infiltrado de eosinófilos com áreas de necrose e massas necróticas contendo hifas no exame histopatológico (MENDOZA *et al.*, 1988; ALFARO & MENDOZA, 1990; EATON, 1993).

Casos de metástase via sistema linfático para pulmões e linfonodos regionais já foram relatados (CHAFFIN *et al.*, 1996). Foram descritos casos nos linfonodos cervicais inferiores, inguinais e submandibulares (CONNOLE, 1973; MURRAY *et al.*, 1978; LEAL *et al.*, 1997), sendo sempre os responsáveis pela drenagem linfática da região atingida pela lesão cutânea. Os linfonodos atingidos apresentavam “kunkers”, dos quais foi possível o isolamento do agente etiológico. Na maioria dos casos de pitiose cutânea, os linfonodos regionais encontram-se aumentados. No entanto, esse achado pode ser utilizado apenas como um indicativo de metástase. Em um estudo de MILLER & CAMPBELL (1984), foram examinados os linfonodos de 15 cavalos com pitiose e todos apresentavam-se aumentados e edematosos, porém em apenas três animais foi detectada metástase no linfonodo inguinal.

1.4.2 Cães e Gatos

Os caninos são a segunda espécie mais atingida pela pitiose, também nas formas cutânea e gastrintestinal. A forma gastrintestinal é a mais comum e manifesta-se com distúrbios digestivos como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia (às vezes sanguinolenta) e presença de massas nodulares, quando submetidos a palpação abdominal (MILLER *et al.*, 1983; BENTINCK-SMITH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; DYKSTRA *et al.*, 1999; GROOTERS, 2003). Os cães afetados são normalmente

oriundos de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados como açudes e banhados (FOIL *et al.*, 1984; FISCHER *et al.*, 1994; DYKSTRA *et al.*, 1999). As lesões gastrintestinais caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino que são compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, intenso infiltrado eosinofílico e presença de hifas (BENTINCK-SMITH *et al.*, 1989; MILLER *et al.*, 1983; MILLER, 1985; FISCHER *et al.*, 1994; LILJEBELKE *et al.*, 2002). O trato digestivo superior também pode ser atingido pela doença, em que PATTON *et al.* (1996) relataram 2 casos de esofagite crônica devido à infecção pelo *Pythium insidiosum*, enquanto HELMAN & OLIVER (1999) descreveram um caso de pitiose canina com uma massa na orofaringe, envolvendo a laringe e esôfago cranial. Já JAEGER *et al.* (2002) descreveram a infecção no cólon e metástases na próstata, com sinais hipertrofia do órgão e sintomas de tenesmo de um cão macho da raça Irish Setter com 4 anos de idade.

As lesões cutâneas apresentam-se como dermatite piogranulomatosa ulcerativa, contendo áreas de necrose infiltrada por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos (FOIL *et al.*, 1984; ENGLISH & FROST, 1984; HOWERTH *et al.*, 1989; DYKSTRA *et al.*, 1999). Em 1997, LARSSON *et al.* relataram o primeiro caso de pitiose canina no Brasil, afetando uma fêmea com lesão cutânea no membro posterior direito e RIET-CORREA *et al.* (1998) e RECH *et al.* (2002) descreveram um caso de pitiose entérica, em Pelotas e Santa Maria, RS, respectivamente (figura 8).

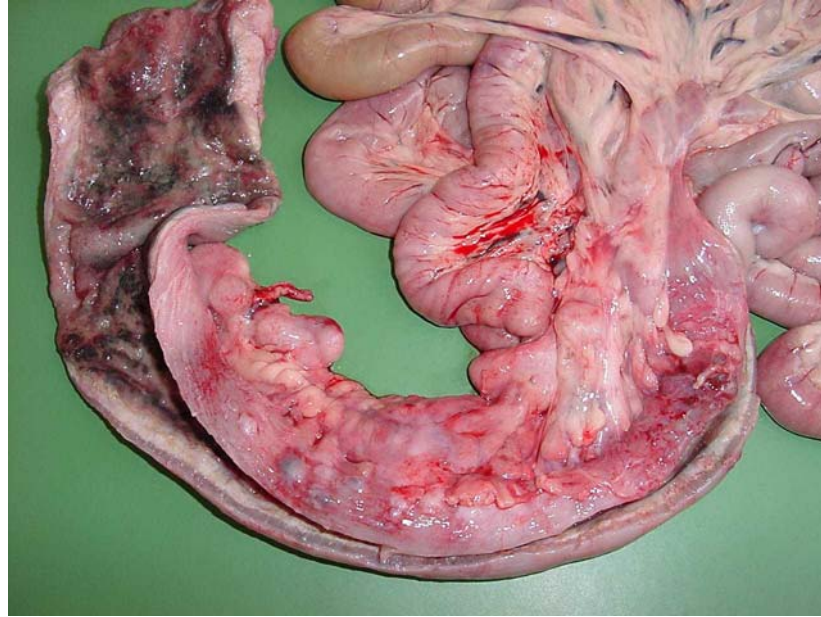


Figura.8: Colite infecciosa de um cão com pitiose. Observa-se formação de massas tumorais e obliteração parcial do órgão. (Foto Setor de Patologia Veterinária, UFSM).

A pitiose em gatos é rara, havendo poucos relatos na literatura. Um relato refere-se a uma infecção nasal e retrobulbar, sem envolvimento de órgãos internos, cujo diagnóstico baseou-se em imunohistoquímica, sorologia através de imunodifusão e isolamento do agente (BISSONNETTE *et al.*, 1991). FOIL apud MENDOZA *et al.* (1996) mencionou a ocorrência de novos casos de pitiose em gatos na Flórida.

1.4.3 Bovinos

A pitiose bovina também é pouco freqüente, havendo apenas dois relatos na literatura. O primeiro na região de Louisiana, EUA (MILLER *et al.*, 1985) e o segundo na região do Pantanal, Brasil (SANTURIO *et al.*, 1998). Esses relatos descreveram lesões cutâneas, geralmente nos membros e caracterizadas por ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada (figura 9). A idade dos animais infectados variou entre três e nove meses de idade. Histologicamente, as lesões apresentaram-se como granulomas dermais multifocais rodeados por tecido conjuntivo fibroso. No centro dos granulomas havia um pequeno número de hifas ramificadas, sem formação de “kunkers” (MILLER *et al.*, 1985; SANTURIO *et al.*, 1998). Incrustação granular ao redor de porções de hifas, sugestiva de deposição de complexos antígeno-anticorpo ou

reação de Splendore-Heoppli, foi observada nos casos descritos por MILLER *et al.* (1985). O relato de SANTURIO *et al.* (1998) menciona a cura espontânea das lesões.



Figura 9: Bovinos da raça nelore de 6 meses de idade, com lesão de pitiose (SANTURIO *et al.*, 1998)

1.4.4 Humanos

A maioria dos casos de pitiose humana foram observados na Tailândia e esporadicamente, nos EUA, Austrália, Haiti e Nova Zelândia. Os primeiros casos foram relatados em 1986, por Thianprasit na Tailândia (apud MENDOZA *et al.*, 1996). Segundo IMWIDTHAYA (1994b), as infecções por *Pythium insidiosum* em humanos, podem apresentar-se de três formas: 1- Lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos. 2- Forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos. 3- Ceratite; podendo ou não ser associada à talassemia.

SATHAPATAYAVONGS *et al.* (1989) relataram cinco casos de arterite, desses relatos de arterite, dois evoluíram para a ruptura fatal da aorta, dois necessitaram a amputação da perna afetada e um paciente foi curado com ressecção do aneurisma. A evolução desses casos demonstra a gravidade da pitiose arterial em humanos. Dois

fatores contribuem para importância da pitiose humana na Tailândia: a prevalência da alfa e beta-talassemia e presença de grandes áreas alagadiças utilizadas para agricultura (IMWIDTHAYA, 1994b). TRISCOTT *et al.* (1993) descreveram dois casos de pitiose subcutânea na Austrália. As lesões apresentaram-se na região periorbital e o aspecto histopatológico apresentou-se similar ao das infecções em eqüinos, porém não foram detectados “kunkers”. Casos de ceratite, causada por *Pythium insidiosum*, foram descritos na Nova Zelândia (MURDOCH & PARR, 1997) e Tailândia (IMWIDTHAYA, 1995). No ano de 2002, HEALTH *et al.*, relatam um caso de pitiose pulmonar, em um menino com 12 anos de idade, portador de leucemia, que entrou no hospital com sintomas de febre, tosse e dificuldade respiratória.

1.4.5 Coelhos

Até o presente momento, não foi possível reproduzir a enfermidade através de infecção experimental nas espécies animais infectadas naturalmente. No entanto, MILLER & CAMPBELL (1983) demonstraram a susceptibilidade de coelhos como modelo experimental para a pitiose. Inoculação subcutânea de água rica em zoósporos produziu nódulos que evoluíram para fibrogranulomas eosinofílicos. Os coelhos inoculados por via intra-peritonal desenvolveram hepatite severa e peritonite, com áreas de necrose contendo hifas, reação granulomatosa com infiltrado de neutrófilos e eosinófilos. As lesões apresentaram características similares à infecção natural dos eqüinos e o *Pythium insidiosum* foi isolado das mesmas (MILLER & CAMPBELL, 1983).

A inoculação subcutânea com zoósporos provoca abscedação progressiva, mas não ocorrem ulcerações comparáveis com a doença natural nos eqüinos, e tampouco a formação de “kunkers”(figuras 10 e 11). No entanto, na avaliação leucocitária, o quadro da pitiose em coelhos é semelhante aos eqüinos, ou seja, ocorre progressiva leucocitose com moderada neutrofilia e leve monocitose (MILLER & CAMPBELL, 1983; MILLER & CAMPBELL, 1983b). Portanto esta espécie serve como modelo experimental para estudo sorológico e avaliação de imunoterapia (LEAL *et al.* 2002).



Figura 10: Fibrogranuloma em coelho após 30 dias de inoculação com 17.500/mL zoósporos de *Pythium insidiosum* (foto LAPEMI).



Figura 11 : Coelho com fibrogranuloma supurado após 60 dias da inoculação com 17.500 zoósporos/mL de *Pythium insidiosum*. Grupo 2 – inoculado com imunoterápico sonicado (foto LAPEMI).

1.5 Histopatologia

Histologicamente nos eqüinos, os “kunkers” apresentam-se como coágulos eosinofílicos de tamanho variado e forma circular com contornos irregulares. Estes coágulos são compostos de hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, especialmente eosinófilos. Em torno das hifas, os eosinófilos estão degranulados e em direção a periferia os grânulos tornam-se mais evidentes. Na borda é comum encontrar-se eosinófilos intactos. A área ao redor do coágulo é composta por um exsudato inflamatório espesso de neutrófilos e eosinófilos. A área entre os “kunkers” é caracterizada por inflamação granulomatosa e supurativa (MILLER & CAMPBELL, 1984; BROWN *et al.*, 1988). Em cortes histológicos corados com coloração especial de prata, pode-se observar as hifas com paredes espessas, esparsamente septadas, irregularmente ramificadas (normalmente em ângulo reto) e medindo de 2 a 6 µm de diâmetro (MILLER & CAMPBELL, 1984; CHAFFIN *et al.*, 1995).

Os achados histopatológicos da pitiose intestinal eqüina variam de tecido conjuntivo fibroso com áreas de necrose de coagulação e focos de mineralização, células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) degeneradas, sem infiltrado eosinofílico (BROWN & ROBERTS, 1988), até ao granuloma eosinofílico crônico (ALLISON & GILLIS, 1990; MORTON *et al.*, 1991; PURCELL *et al.*, 1994). As hifas são visualizadas através da coloração especiais com sais de prata, medindo de 2 a 8 µm de diâmetro, com parede espessa, raras septações e ramificações irregulares, geralmente encontrados dentro de focos de mineralização. Os “kunkers”, característicos das lesões cutâneas não foram observados nos casos de pitiose intestinal (BROWN & ROBERTS, 1988; ALLISON & GILLIS, 1990; MORTON *et al.*, 1991; PURCELL *et al.*, 1994).

A histopatologia das lesões da pele de coelhos inoculados via subcutânea, apresentaram alterações progressivas com necrose aguda acompanhada de infiltrado granulocítico 3 dias após a inoculação experimental. Vinte dias pós-inoculação, os coelhos passaram a apresentar lesões com abscesso eosinofílico fibrogranulomatoso (MILLER & CAMPBELL, 1983).

1.6 Diagnóstico

Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose baseava-se nos aspectos clínicos, histopatológicos e no isolamento e identificação do agente através de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas. A identificação precoce da

doença, no entanto, torna-se difícil através desses métodos. Atualmente, métodos como imunohistoquímica e técnicas sorológicas auxiliam e suportam um diagnóstico precoce e correto (MENDOZA *et al.*, 1996). Em 1988, BROWN *et al.*, descreveram pela primeira vez o método de imunohistoquímica para diagnóstico da pitiose equina, que foi posteriormente utilizada por vários autores (HOWERTH *et al.*, 1989; FISCHER *et al.*, 1994; PURCELL *et al.*, 1994). O diagnóstico diferencial inclui habronemose, neoplasia, tecido de granulação exuberante e granulomas fúngicos e bacterianos (CHAFFIN *et al.*, 1992).

O desenvolvimento de técnicas sorológicas foi impulsionado por MILLER & CAMPBELL (1982b), que desenvolveram técnicas para o diagnóstico e monitoramento da resposta imunológica em eqüinos afetados. Esses autores desenvolveram as técnicas de imunodifusão em gel de ágar (ID), fixação do complemento (FC) e um teste de hipersensibilidade intradérmica (TI), para diagnosticar e avaliar a resposta imune humoral e celular de cavalos com pitiose. Os testes realizados em cavalos com pitiose clínica comprovada, diagnosticaram positivamente 100% (ID), 82% (FC) e 64% (TI) dos casos. Esses dados comprovaram que o teste de ID apresenta alta sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos anti *P. insidiosum* (MILLER & CAMPBELL, 1982b). O teste de FC foi utilizado somente na Austrália, pois além de menos sensível e específico que ID, é um teste difícil de realizar e requer pessoal experiente para sua realização (MENDOZA *et al.*, 1996).

KAUFMAN *et al.* (1990) demonstraram a eficiência da ID para o sorodiagnóstico das zigomicoses causadas por *Basidiobolus ranarum* e *Conidiobolus coronatus* em humanos e animais, assim como para pitiose e, comprovaram que o teste é eficiente para o diagnóstico diferencial destas três micoses em humanos e animais. Outros autores também demonstraram a eficiência e utilidade da ID para o diagnóstico da pitiose.

MENDOZA *et al.* (1997) desenvolveram um teste de ELISA para o sorodiagnóstico de pitiose em humanos e animais, utilizando antígeno solúvel de hifas sonicadas. Amostras de soro de humanos e animais saudáveis e com pitiose clínica foram testadas e os resultados comparados com o teste de ID. Os resultados indicam que o teste de ELISA é eficiente para o diagnóstico da pitiose, e possui especificidade semelhante à ID, porém com melhor sensibilidade. No Brasil, ROSA *et al.* (1999) desenvolveram um teste ELISA para diagnóstico de pitiose equina e, ALVES *et al.* (2001) desenvolveram a técnica de “ELISA-conta” para detecção de soropositividade

para pitiose, enquanto SANTURIO *et al.* (2001) descreveram a padronização de teste ELISA para detecção de IgG em coelhos imunizados com antígenos de *P. insidiosum*. Já, GROOTERS *et al.* (2002) desenvolveram teste de ELISA para diagnóstico sorológico precoce de pitiose em caninos, enquanto KRAJAEJUN *et al.* (2002) fizeram o mesmo para diagnóstico de pitiose em humanos.

Um teste de dot-blot modificado foi desenvolvido para detecção de IgG anti-pythium em coelhos e eqüinos. A técnica desenvolvida utilizou sistema de luminescência química para visualização da reação, no entanto, a técnica pode ser adaptada para um sistema de visualização direta na membrana, podendo ser utilizada como um teste de campo, pela sua especificidade, sensibilidade, praticidade e baixo custo (LEAL,1999).

O sucesso no isolamento de *P. insidiosum* é alto quando amostras de biópsias forem armazenadas ou transportadas à temperatura ambiente, com o acréscimo de antibióticos, entre 1 e 3 dias antes de seu processamento no laboratório. Quando o meio de transporte da biópsia não contiver antibióticos é melhor transportá-la a 4°C (GROOTERS *et al.*, 2002b). Estes dados sugerem que a inibição do crescimento bacteriano, que contamina a amostra, aumenta as chances de isolamento de *P. insidiosum* de tecidos infectados. Estes autores sugerem, também, o uso, como rotina para isolamento do agente, de ágar V8 (MILLER, 1955), acrescido de estreptomicina (200µg/mL) e ampicilina (100µg/mL). Pedacos pequenos de tecido fresco, não macerados, podem ser distribuídos diretamente na superfície do ágar e incubado a 37°C. Crescimento típico é observado entre 12 e 24 horas após (GROOTERS, 2003). A identificação de isolados de *P. insidiosum* pode ocorrer através do aspecto da colônia e na característica das hifas. As colônias em ágar V8, sabouraud dextrose (figuras 12 e 13) ou ágar farinha de milho (CMA), apresentam-se submersas de coloração branca ou hialina (DE COCK *et al.*,1987). Os zoósporos podem ser produzidos, a partir do cultivo de *P. insidiosum* com 1 a 2 dias de cultivo (figura 14), em folhas de grama estéreis sobre ágar água a 2% e incubação a 37°C pelo período de 18 a 24 horas. Após as folhas infectadas pelo *Pythium* são colocadas em solução de sais minerais diluída a 1%. Cerca de 2-4 horas de incubação a 37°C os zoósporos crescem a partir de hifas terminais (GROOTERS, 2003).

O sequenciamento gênico com amplificação do RNA ribossomal, região ITS 1, através de PCR (reação de polimerase em cadeia) é uma ferramenta poderosa para detecção e identificação de *P. insidiosum* (GROOTERS & GEE, 2002; REIS *et al.*,

2003).



Figura 12: Cultivo de *P. insidiosum* em caldo sabouraud a 37°C com crescimento em 24 horas. (foto LAPEMI)

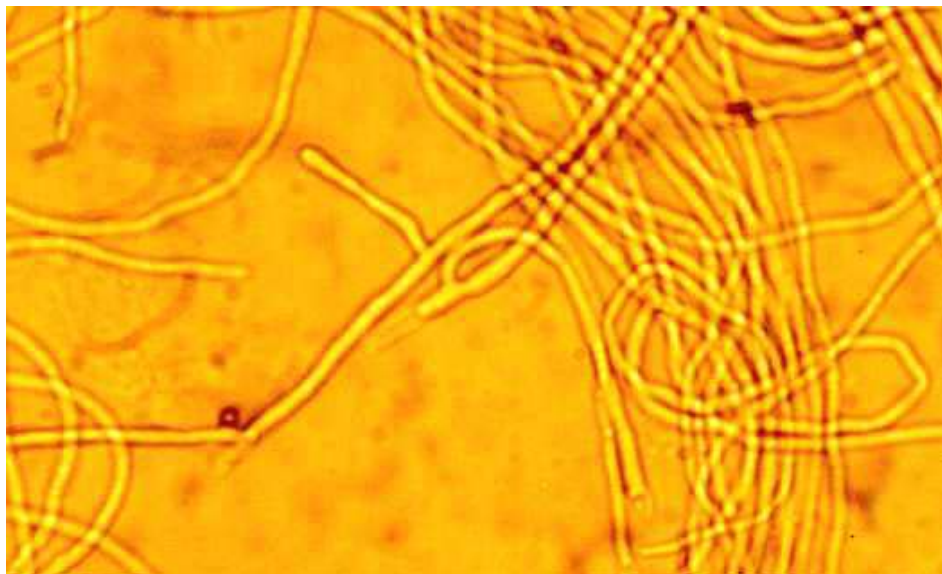


Figura 13: Hifas de *Pythium insidiosum* em cultivo em ágar farinha de milho (400x) [foto LAPEMI]



Figura 14: Cultivo de isolado de *P. insidiosum*, para produção indução de zoosporangênese, em folhas de *Paspalum notatum* em ágar água a 2%, à temperatura de 37°C. À direita crescimento em 24 horas e à esquerda crescimento de 56 horas. (Foto LAPEMI).

1.7 Tratamento

O tratamento de infecções causadas pelo *Pythium insidiosum* em animais e humanos é complicado pelas características singulares do agente. O *P. insidiosum* difere dos fungos verdadeiros na produção de zoósporos móveis e na composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto o *Pythium* contém celulose e β -glucanas. A membrana plasmática não contém esteróides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas (FOIL, 1996). Devido à essas características, não existe droga antifúngica eficiente contra o *P. insidiosum* (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989; FOIL, 1996). Os fitopatógenos do gênero *Pythium* são sensíveis aos inseticidas normalmente utilizados em plantas, porém esses compostos são tóxicos aos mamíferos, impossibilitando seu uso para o tratamento da pitiose (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989). Um fungicida utilizado em plantas (Metalaxil), foi testado no tratamento de cães, porém com resultados pouco consistentes, em parte pela toxicidade do composto (FOIL, 1996).

O sucesso das diferentes formas de tratamento é variável e, em muitos casos influenciado pelo tamanho e duração da lesão, idade e estado nutricional do animal. O tratamento tradicional da pitiose eqüina é cirúrgico, sendo o procedimento mais utilizado. A intervenção cirúrgica requer retirada de toda área afetada, com margem de segurança para evitar as recidivas, porém isso é dificultado pelas estruturas anatômicas envolvidas, principalmente nos membros (MILLER, 1981). O tratamento cirúrgico

apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais, onde seja possível a retirada de toda área afetada.

No tratamento químico as drogas mais utilizadas até o momento foram a anfotericina B, cetoconazole, miconazole, fluconazole e itraconazole, além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e sódio (SANTURIO *et al.*, 2003). McMULLAN *et al.* (1977), obteve 50% de eficiência associando a remoção cirúrgica e anfotericina B; 30% apenas com anfotericina B e 20% das fomicoses subcutâneas não responderam aos tratamentos.

Segundo GONZALES *et al.* (1979) o tratamento das fomicoses subcutâneas respondem ao iodeto de potássio é mais eficiente quando usado após a extirpação cirúrgica do granuloma. CHAFFIN *et al.* (1992) também relataram o sucesso do tratamento cirúrgico seguido de iodeto de sódio em um potro com pitiose cutânea. Entretanto, MEIRELES *et al.* (1993) não obtiveram sucesso em dois eqüinos tratados com iodeto de potássio endovenoso, até mesmo quando associado à cirurgia.

Até o presente momento, nenhuma das terapias antifúngicas propostas para a pitiose canina (sistêmica ou cutânea) apresentaram resultados satisfatórios (tabela 1), entre as drogas testadas destacam-se a anfotericina B, iodeto de sódio, flurocitosina, cetoconazole (ADER, 1979; ENGLISH & FROST, 1984; DYKSTRA *et al.*, 1999). A última droga testada foi o itraconazole (5mg/kg/60 dias), porém não apresentou nenhuma melhora (DYKSTRA *et al.*, 1999). Segundo HNILICA (1998), a cirurgia continua como opção mais segura para o tratamento da pitiose canina.

Tabela 1: Descrição de 15 casos de pitiose em cães, mostrando que o tratamento com antifúngicos não mostrou eficiência na cura da enfermidade (DYKSTRA *et al.*, 1999).

Cão (n)	Idade (meses)	Raça	Sexo	Duração sinais clínicos (meses)	Cão nadava Regularmente?	Terapia Antifúngica	Resultado
01	11	English Setter	F	4	+	Itraconazole, Vacina pitiose	Eutanasia
02	11	Labrador	M	3	+	Cetoconazole, Itraconazole, Nistatina lipossomica Cirurgia	Curado após 2 anos
03	24	German Shepherd	F	Desconhecida	Desconhecido	Anfotericina B, itraconazole, cirurgia	Eutanásia
04	12	Mista	F	Desconhecida	Desconhecido	Itraconazole, cirurgia	Eutanásia
05	9	Poodle	M	2	Desconhecido	Nenhuma	Desconhecido
06	9	German Shepherd	F	6	Desconhecido	Nenhuma	Desconhecido
07	48	Catahoula	F	5	Desconhecido	Nenhuma	Desconhecido
08	24	Sheltie	F	1	Desconhecido	Nenhuma	Eutanásia
09	24	Mista	F	4	+	Nenhuma	Eutanásia
10	36	German Shepherd	M	1,5	Desconhecido	Cetoconazole	Desconhecido
11	24	German Shepherd	M	6	+	Cetoconazole	Desconhecido
12	24	German Shepherd	F	Desconhecida	+	Nenhuma	Eutanásia
13	12	German Shepherd	M	0,5	+	Cetoconazole	Eutanásia
14	12	Labrador	F	6	+	Anfotericina B, cetoconazole, itraconazole, vacina pitiose	Eutanásia
15	48	Retriever Mix	M	3	Desconhecido	itraconazole	Eutanásia

Os resultados obtidos com as drogas antifúngicas são controvertidos, tanto no tratamento clínico como nos testes de sensibilidade *in vitro*. Em um estudo de SEKHON *et al.* (1992) os poliênicos anfotericina B, hamycina e seus análogos não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azólicos fluconazole, cetoconazole e miconazole inibiram os isolados de *P. insidiosum* testados *in vitro*, com o miconazole apresentando

os melhores resultados. Em outro teste as drogas anfotericina B, flucitosina, miconazole e griseofulvina não inibiram o crescimento do fungo, enquanto o itraconazole apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *P. insidiosum* testado (SHENEP *et al.*, 1998). De acordo com estes autores, a associação de terbinafina e itraconazole apresentaram efeito sinérgico e foram utilizados, com sucesso, no tratamento de um menino com infecção facial. Em outro relato, dois jovens com infecção subcutânea na região periorbital responderam bem ao tratamento com anfotericina B (TRISCOTT *et al.*, 1993), contrariando os resultados obtidos nos testes *in vitro*. Também se obteve remissão clínica de um quadro de pitiose pulmonar, em um menino com 12 anos de idade acometido de leucemia, após 12 meses de tratamento com itraconazole em combinação com anfotericina B lipossômica (HEALTH *et al.*, 2002).

SEDRISH *et al.* (1997) relataram o sucesso do uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio como tratamento suplementar após a remoção cirúrgica de lesões de pitiose eqüina.

Segundo HUBERT & GROOTERS (2002), a ressecção cirúrgica total do granuloma combinada com imunoterapia específica para *P. insidiosum* é o tratamento mais indicado para cura de pitiose clínica em eqüinos.

1.8 Imunoterapia

Uma alternativa para o tratamento da pitiose eqüina foi proposto por MILLER, (1981), que desenvolveu um imunobiológico (imunoterápico) a partir de culturas do próprio agente, no qual utiliza-se um macerado de hifas, sonicadas e acondicionados em frascos. O índice de eficiência da imunoterapia foi em torno de 53% e 75% quando associado a cirurgia (MILLER, 1981; MILLER & CAMPBELL, 1982b)

No decorrer da década de 80 e 90 vários autores utilizaram a imunoterapia, cada um com modificações na técnica originalmente descrita por MILLER. Em 1986, MENDOZA & ALFARO utilizaram como antígeno apenas o sobrenadante das culturas, objetivando diminuir a reação no local de aplicação. Foram utilizados cinco animais para o teste, dos quais três foram recuperados. MENDOZA *et al.* (1992a), compararam duas vacinas para tratamento da pitiose eqüina, em 71 cavalos infectados. Uma vacina utilizou massa celular como antígeno e a outra utilizou um antígeno solúvel

concentrado. As duas vacinas apresentaram resultado positivo em cavalos com lesões com menos de dois meses, com 60% e 70% de eficiência, respectivamente (tabela 2).

MONTEIRO (1999) relatou o teste de eficiência de um imunobiológico (PitiumVac) para o tratamento da pitiose equina, produzido a partir de culturas do *Pythium insidiosum*, baseando-se na metodologia descrita por Miller (1981). O índice de cura variou de 50% a 83,3% entre os grupos tratados (figura 16).

Em 1998, THITITHANYANONT *et al.* descreveram o uso de um imunoterápico em um menino talassêmico de 14 anos de idade, infectado pelo *P. insidiosum*. Após insucesso com tratamentos a base de anfotericina B, iodetos, cetoconazole e cirurgia, a cura foi obtida após duas aplicações (100µl) do imunoterápico, com intervalo de 14 dias.

Apesar dos estudos sobre a doença e a imunoterapia, ainda não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção por *Pythium insidiosum*, em parte pelas diferenças entre o *Pythium insidiosum* e os fungos patogênicos para os mamíferos. De acordo com MILLER (1981), o caráter progressivo da doença em equinos imunocompetentes sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio na resposta imunológica. Esse autor acredita que mesmo sendo antigênicas, as hifas não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro, devido à marcante reação inflamatória. Em 1996, MENDOZA *et al.* propôs o possível mecanismo imunológico desencadeado na pitiose equina. No início da infecção, as hifas de *P. insidiosum* liberariam antígenos solúveis que estimulariam a produção de IgE. Essas imunoglobulinas ligariam-se a superfície das hifas e ativariam os mastócitos, que liberariam seus fatores quimiotáticos para atrair eosinófilos para o sítio da infecção. Os eosinófilos ligar-se-iam a porção Fc das IgE nas hifas e eventualmente degranulariam, protegendo a hifa do sistema imune. O mecanismo proposto seria semelhante ao relatado nas infecções parasitárias. Segundo os autores, há evidências da presença de antígenos solúveis dispersos na lesão e não apenas no interior dos “kunkers”. Mais tarde, no ano de 2003, MENDOZA *et al.* ampliam sua hipótese conforme o esquema da figura 15.

As explicações para cura induzida pela imunoterapia são apenas propostas, baseadas nas características clínicas, histopatológicas e sorológicas da infecção e seu tratamento. Acredita-se que os antígenos citoplasmáticos expostos ao sistema imune dos animais via vacinação originariam uma resposta humoral e celular capaz de combater a infecção natural. A resposta humoral pode ser demonstrada pelos testes de

imunodifusão e Western immunoblot, enquanto que a resposta celular pode ser evidenciada pelo teste de hipersensibilidade intradérmica e alteração no infiltrado inflamatório (MENDOZA *et al.*, 1996). Segundo MENDOZA *et al.* (1992b), o soro de equinos infectados, testados pelo immunoblot, demonstraram a presença de três proteínas imunodominantes (28, 30 e 32 kDa) e, amostras de soro equino obtidas um ano após a cura pela imunoterapia também apresentaram anticorpos contra esses três antígenos.

Trabalho com western immunoblot (LEAL, dados não publicados) sugere a presença de 5 antígenos imunodominantes e na avaliação de soro equino pré e pós-tratamento com imunoterápico, não apresentou alterações no perfil de IgG durante a imunoterapia. Isso questiona sobre a real importância desses antígenos imunodominantes na cura dos equinos.

MILLER (1981) propôs dois modelos para explicar a ação dos anticorpos. O primeiro seria um mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo e mediado por células, que envolveria linfócitos, macrófagos e talvez eosinófilos ligados a anticorpos, sobretudo IgG. O segundo modelo proposto envolveria anticorpos e o sistema complemento, os anticorpos específicos estimulados pela vacina ativariam o sistema complemento, danificando a parede celular e promovendo a lise do agente.

MENDOZA *et al.* (1996) acreditam que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia, baseiam-se principalmente na resposta celular. Isto é sustentado pelas alterações teciduais após início da imunoterapia, com mudança de inflamação eosinofílica no inicial para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T. Os autores acreditam que os antígenos presentes no imunógeno induziriam esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais. Entretanto, NEWTON & ROSS (1993) verificaram que o nível de anticorpos anti-*Pythium* aumenta em equinos doentes submetidos à imunoterapia. De acordo com os autores, o aumento do nível de anticorpos auxiliaria na cura.

Tabela 2: Efeitos de imunoterápicos em diversos processos de fabricação:

Processo fabricação de imunoterápico contra pitiose	Animais testados (n)	Doses (n)	Cura (%)	Autores
Hifas sonicadas	30 equinos	3	53	Miller, 1981
Antígenos solúveis	5 equinos	3	60	Mendoza & Alfaro, 1989
Hifas liquidificadas ou maceradas liofilizadas	110 equinos	6	83	Monteiro, 1999
Antígeno solúvel + hifas sonicadas	18 equinos	3	72	Mendoza <i>et al.</i> 2003
Antígeno solúvel + hifas sonicadas	6 cães	4	33	Mendoza <i>et al.</i> , 2003.

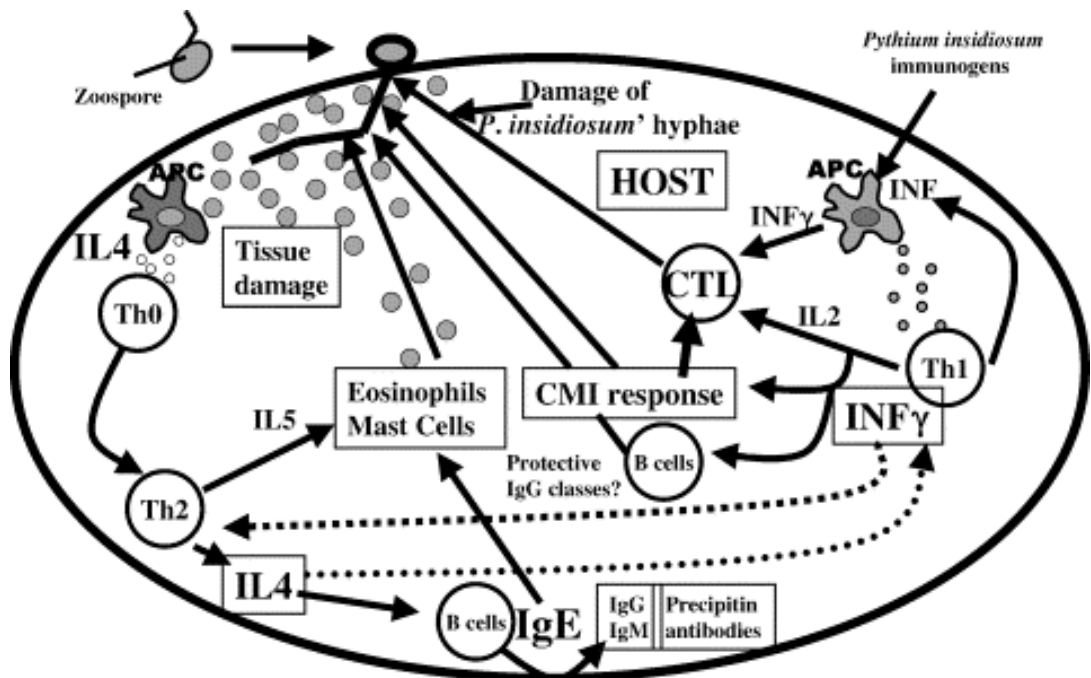


Figura 15: Hipótese proposta para os efeitos curativos dos imunoterápicos contra pitiose baseado em dados de humanos e eqüinos (MENDOZA *et al.* 2003). A Pitiose quando o hospedeiro entra em contato, através de uma ferida, com zoosporos de *P. insidiosum*, é formado um tubo germinativo que penetra mecanicamente no tecido. Uma vez nos

tecidos, as hifas de *P. insidiosum* liberam exoantígenos [pontos grandes no desenho] denominados de antígenos de apresentação celular (APC). Os APC liberam IL4 (interleucina 4) que estimula a atração dos linfócitos T auxiliar (Th0), que também estimulam linfócitos Th2, que por sua vez induzem a produção de mais IL4 e IL5. As IL4 regulam a expressão de Th1 (seta pontilhada) e estimulando, por sua vez, células B para produção de IgE, IgM e IgG que uma vez precipitados são detectados por testes de diagnóstico. As IL5 e IgE desencadeiam a mobilização de eosinófilos e mastócitos para o local da lesão (seta). Estas células vão degranular (são responsáveis pelas lesões teciduais) sobre as hifas de *P. insidiosum*, provocando o fenômeno de Hoeppli-Splendore que, mais tarde, irá desenvolver os “kunkers” na pitiose equina, somente (seta). As hifas de *P. insidiosum* multiplicam-se no interior dos “kunkers” onde produzem exoantígenos em grande quantidade; um evento que, no final, bloqueia a resposta imune devido ao Th2. Quando os imunógenos do imunoterápico são injetados no hospedeiro com pitiose (parte superior à direita do esquema), os antígenos que estão presentes no seu APC são distintos que na infecção natural. Os APC liberam interferon γ (INF γ) que ativam Th0 para Th1. O Th1 ativado produz mais IFN γ e, também, IL2. Por sua vez, IL2 e INF γ irão ativar mediadores de células mononucleares como resposta imune (CMI) composta por linfócitos T e macrófagos que danificam e destroem a hifa de *P. insidiosum* (seta). Não está claro se durante a imunoterapia, as IL2 e IFN γ também estimulariam linfócitos B para produzir IgG protetores. A produção de IFN γ , no local da infecção, pelos APC e o Th1 produzidos, irão resultar numa menor transformação Th2. Portanto, a atração de Th1 e o bloqueio de Th2 poderia explicar porque eqüinos, cães e humanos com pitiose são curados após injeções com imunoterápicos.

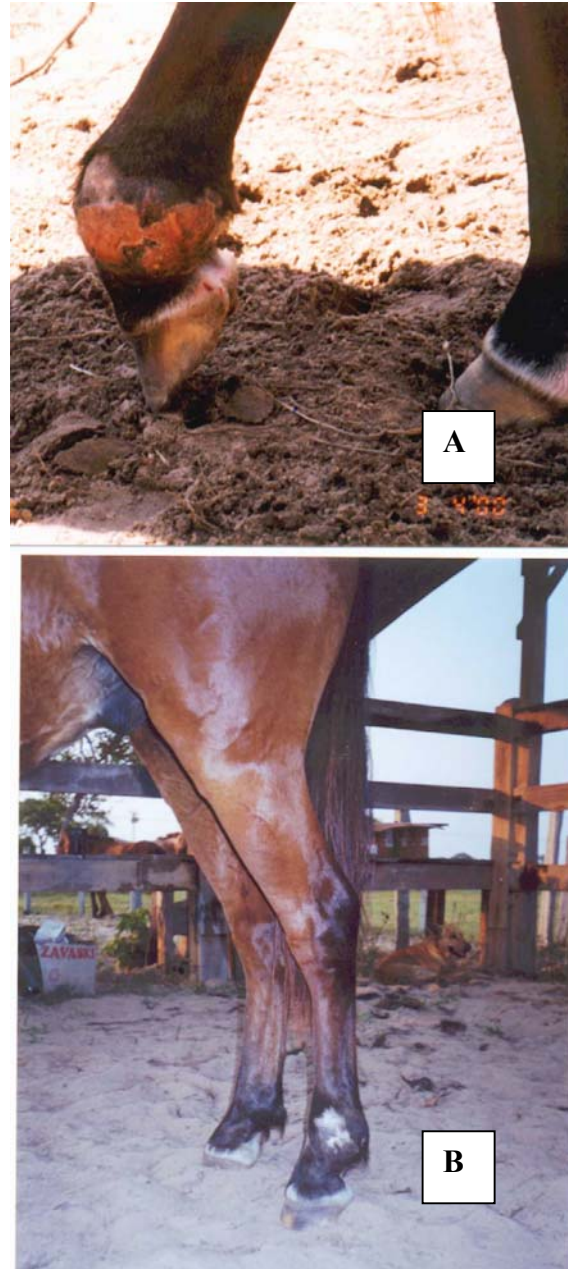


Figura 16: Eqüino com pitiose clínica na pata (A) e o mesmo animal totalmente curado (B) após receber 4 doses do imunoterápico PitiumVac, produzidas a partir de hifas maceradas (liquidificadas) de *Pythium insidiosum* (cepa DMVP 118/98 – CBS 101555) [Foto LAPEMI].

Os imunoterápicos em uso podem ter sua atuação prolongada e potencializada através de adjuvantes, como ficou demonstrado por LEAL *et al.* (2002) em uso em coelhos.

ARTIGO PUBLICADO:

O artigo “Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosa developed and evaluated”, publicado na Revista Vaccine vol.21 p. 2535-2540, em 2003, anexado nas páginas seguintes, é a âncora desta tese e comprova que a sonicação não é bom método para disponibilizar todos os antígenos do *Pythium insidisum*.



Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated[☆]

J.M. Santurio^{a,*}, A.T. Leal^a, A.B.M. Leal^a, R. Festugatto^a, I. Lubeck^a,
E.S.V. Sallis^b, M.V. Copetti^a, S.H. Alves^a, L. Ferreira^c

^a Laboratório de Pesquisas Micológicas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, FZVA, Uruguaiana, RS, Brazil

^c Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 15 July 2002; received in revised form 13 December 2002; accepted 10 January 2003

Abstract

Pythiosis is a granulomatous disease of horses, cattle, dogs, cats and humans identified in tropical and subtropical areas and caused by *Pythium insidiosum*, a zoospore fungus. Experimental models of pythiosis in naturally infected species have not yet been reported but, rabbits may be inoculated with zoospores as an experimental model for studying the disease. The present study evaluates the efficacy of three different immunotherapies in the rabbit model. Approximately 17,500 zoospores of oomycete *P. insidiosum* (CBS 101555 strain) were inoculated in each animal to generate the disease. Immunotherapies were produced from vortexed or sonicated cultures of the same strain. Four groups of five animals were employed: group 1, placebo; group 2, sonicated immunotherapy; group 3, mixed immunotherapy; and group 4, vortexed immunotherapy. All rabbits were inoculated with viable zoospores one month before administration of the immunotherapies. Eight doses of immunotherapy or placebo were used in each animal with a 14 day interval between injections. Rabbits receiving the vortexed immunotherapy were most effectively protected ($P < 0.05$), showing a decrease in the area of coastal nodules due to *Pythium insidiosum* by 71.8% after 26 weeks of evaluation. Moreover, two animals in this group showed complete remission of the infection at the end of the 26 weeks. In contrast to these findings, rabbits given the sonicated immunotherapy did not show any protection and had an increase of 211.8% in the size of lesions. This failure of sonicated immunotherapy may reflect denaturation of protective antigens due to the sonication method. © 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pythiosis; *Pythium insidiosum*; Rabbit; Zoospores; Immunotherapy; Immune therapy

1. Introduction

Pythiosis is a granulomatous disease of horses, cattle, dogs, cats and humans that occurs in tropical and subtropical areas [1,4–8,10,13,17,20] and is caused by *Pythium insidiosum*, a zoospore fungus of the Phylum Oomycota, Kingdom Stramenopila [2]. The Equine species is most often infected, producing mainly cutaneous and subcutaneous lesions, and disease is next most prevalent in the dog [11].

Eosinophilic granulomas with necrotic masses called “kunkers” characterize the disease in the horse [11]. Ophthalmic, subcutaneous and systemic forms of the infection occur in humans, the latest two being associated with alpha

and beta-thalassemias that are highly prevalent in southeast Asia [5,6,20].

Experimentally induced pythiosis due to inoculation of *P. insidiosum* into naturally infected species has not been reported until now. Horses previously presenting with pythiosis and subjected to subcutaneous inoculation of zoospores (30,000–50,000) do not show clinical signs of infection suggesting that protective immunity is induced (our personal observation). By contrast, rabbits are sensitive to zoospore inoculation and can be used as experimental models for studying the disease [14].

Several treatments have been used in clinical cases of equine disease including drug therapy (e.g. amphotericin B), excisional surgery and immune therapy. Immune therapy was initially described by Miller [12] and although showing promising results, response not very consistent [15].

In this work, rabbits were experimentally infected with 17,500 zoospores of the oomycete *P. insidiosum* in order to evaluate the efficacy of three different immunotherapies.

[☆] This manuscript is based on a thesis submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the degree of Doctor in Veterinary Science, PPGCV/FAVET, UFRGS.

* Corresponding author. Fax: +55-55-2208806.

E-mail address: santurio@mail.ufsm.br (J.M. Santurio).

2. Material and methods

2.1. *Pythium*

DMVP 118/98 (CBS 101555) strain, isolated from a pythiosis lesion in the chest of a foal and cultivated in 1.5% Corn Meal Agar at 27 °C for 7 days, was used to experimentally inoculate rabbits and to producing the immunotherapies with three different protocols.

2.2. Zoosporegenesis

Ten pieces of *Paspalum notatum* grass approximately 2 cm long were autoclaved for 2 h and distributed over *P. insidiosum* cultures and incubated at 37 °C for 24 h. Pieces of infected grass were transferred to an induction medium that contained: solution 1, K₂HPO₄ 1.0 M, KH₂PO₄ 1.0 M, (NH₄)₂ 3.66 M, 500 ml of distilled water; solution 2, MgCl₂ 6H₂O 0.5 M, CaCl₂ 2H₂O 0.5 M, 250 ml of distilled water. The induction medium final composition was 0.5 ml of solution 1 0.1 ml of solution 2 in 1000 ml of sterile distilled water. Induction medium containing pieces of grass infected by *P. insidiosum* was incubated at 37 °C for 8 h. Pieces of grass were observed by microscopy and zoospores were counted using a Neubauer chamber.

2.3. Rabbits

A total of 24 'New Zealand' male rabbits, aged between 2 and 3 months were used in this work. A subcutaneous inoculation of 1 ml of zoospores was made into the coastal region of each rabbit. An average of 17,500 viable mobile zoospores/ml of induction medium was given. Inoculated rabbits were checked weekly, by measuring the subcutaneous nodular area (cm²) using a sliding calliper, when nodules were present. Nodular development was evaluated after 30 days of inoculation. Those rabbits not developing lesions were eliminated from the experiment. ELISA was used to confirm *Pythium* infection [16].

2.4. Elisa tests

The antigen used for the immunization of the rabbits it was prepared of cultures of *P. insidiosum* strains CBS 101555. The samples of this Oomycete were cultivated under agitation in Sabouraud broth at 37 °C for 7 days. After the cultivation it was filtered and the mycelia diluted in solution of PBS and sonicated until disruption and centrifuged at 6000 rpm for 5 min to collect the supernatant to use as antigen. Plates of polystyrene of 96 wells were sensitized with the antigen diluted in PBS and was incubated to 4 °C for overnight that there was the absorption of the antigen in the surface of the plate. Each well received 10 µg of proteins and, after the incubation period, the plates were washed and stored 4 °C until the moment of the use. The tested serums were diluted in PBS in pH 7.2 (1:2000), distributed 100 µl in each

well in the plates and incubated at 37 °C for 1 h. Then, the plates were incubated with specific secondary antibody for the species (anti-IgG conjugated with peroxidase) with dilution of 1:10,000. The plates received the chromogen buffer (*ortho*-phenylene-diamine) and the reading was carried out through a spectrophotometer of plates with 490 nm.

2.5. Experimental design

Rabbits developing lesions alteration were divided to four groups of five rabbits each:

- group 1, placebo with sterile distilled water;
- group 2, sonicated immunotherapeutic;
- group 3, mixed immunotherapeutic; and
- group 4, vortexed immunotherapeutic.

All animals received eight doses of the immunotherapeutic or placebo at intervals of 14 days between injections that started after 1 month of inoculation with viable mobile zoospores.

2.6. Immunotherapies

P. insidiosum was cultivated in 150 ml of Sabouraud broth incubated at 37 °C in a shaker at 130 rpm for 8 days. Inactivation of the mycelial material with 0.02% thimersal for 20 min was done after the withdrawal of the culture from the shaker.

2.6.1. Sonicated immunotherapeutic

Cultivated mycelia were harvest by filtration and washed with PBS (pH 7.2) in the proportion of 5 ml of PBS for each gram of mycelia obtained. After this, the material was sonicated in five series of 3 min, at 80 W and pulses of 3 min. Added 50 µg of chloramphenicol/ml was added to the material, 2 ml aliquots were prepared in glass bottles with a rubber lid and lyophilized for 12 h. The weight of lyophilized material was ranging from 0.031 to 0.034 g.

2.6.2. Vortexed immunotherapeutic

The mycelial mass was disrupted in a vortex at 1800 rpm during 5 min. Sulfuric ether ((C₂H₅)₂O) at a 50 vol.% of the mass of the material was added and the final product left resting for 15 min before disrupting it again for more 5 min. Supernatant was harvested and 50 µg of chloramphenicol/ml added to the remaining material. The final product was bottled with 2 ml in each glass with a rubber lid and lyophilized for 12 h. The weight of lyophilized material was ranging from 0.031 to 0.033 g.

2.6.3. Mixed immunotherapeutic

This was obtained by mixing 1 ml of sonicated immunotherapeutic and 1 ml of vortexed immunotherapeutic. And the product was divided in 2 ml aliquots bottled in glass with rubber lid and lyophilized for 12 h. The weight of lyophilized material was ranging from 0.032 to 0.034 g.

2.6.4. Placebo

Aliquots of 2 ml of bi-distilled water were bottled in glass with a rubber lid.

2.6.4.1. Injecting the immunotherapies and placebo. Rabbits were randomly chosen to make groups after they were inoculated with zoospores. The first dose of immunotherapeutic or placebo was given subcutaneous by on the 30th day after inoculation and in the coastal region opposite to the zoospore injection. This procedure was repeated each 14 days on eight occasions. All rabbits were humanely killed and necropsied after 26 weeks of observation. The subcutaneous tissue (site of inoculation of *P. insidiosum* zoospores) was collected and fixed in 10% buffered formalin and routinely processed for histopathologic evaluation.

2.6.5. Statistics

Standard average ANOVA test of the percentage variation of measurements of nodular areas was applied. Variation of measurements per treatment and significance were compared using the Tukey test. All significance decisions were based on a probability of $P < 0.05$.

3. Results

Results obtained are shown in Figs. 1–6. Four animals of group 4 (vortexed immunotherapeutic) had smaller lesional areas than animals in other groups one month after zoospore inoculation. Lesions were granulomatous with fibrose and predominance of eosinophilic necrosis containing plasma

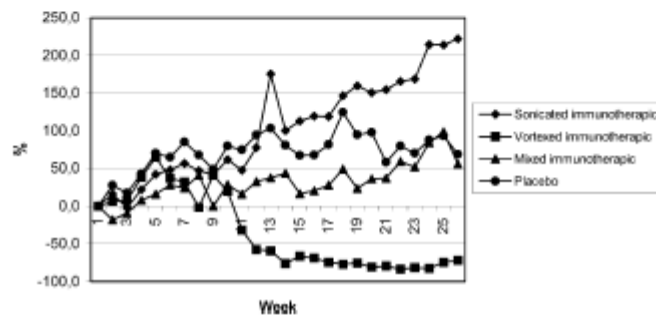


Fig. 1. Percentage variation of lesions size in rabbits inoculated experimentally with *P. insidiosum* zoospores and vaccinated with three different immunotherapies.

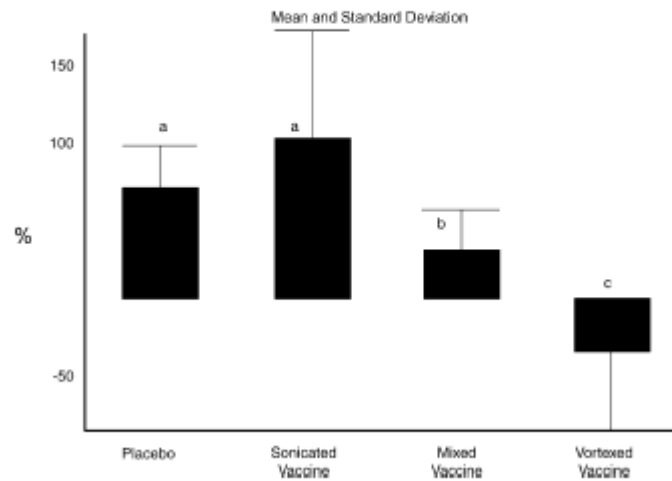


Fig. 2. Percentage variation of nodular lesion in rabbits vaccinated with three different immunotherapies against pythiosis. Column with no common superscript differ significantly for Tukey test ($P < 0.05$).

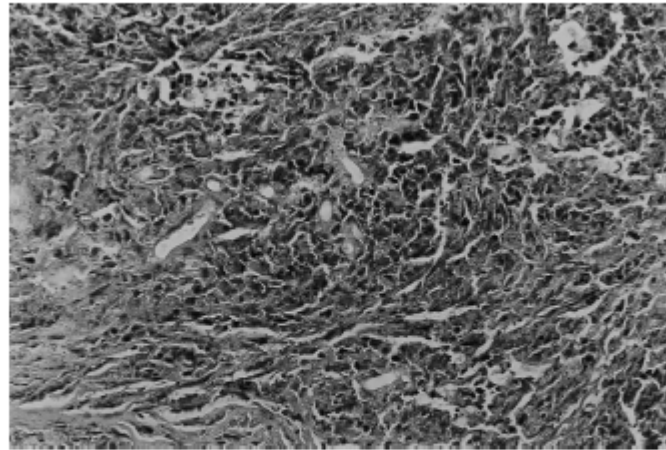


Fig. 3. Subcutaneous tissue of a rabbit inoculated with *P. insidiosum* and necropsied after eight doses of placebo. Area of necrosis with cell debris and intralésional profiles of *P. insidiosum*. HE. Objective 40 \times .

cells and macrophages too. Some rabbits, especially of group 1 (placebo), showed a discharge coming from the wound with no change in the size of the compromised area. This moist wound became dried in a few days. Rabbit number 5 of group 4 died 40 days after zoospore inoculation and 8 days after the first dose of vortexed immunotherapeutic. Pythiosis with metastasis lungs and right kidney as well as pneumonia were pointed as *causa mortis* by necropsy. The

remaining animals of group 4 were followed until the end of the experiment. Data from group 4 was therefore collected from the four remaining animals after the 40th day of starting the experiment. All rabbits showed granulomatous lesions ranging in size from 3.2 to 50 cm², 1 month after inoculation. Nodules were firm and well-circumscribed. Efficacy of immunotherapeutic was observed in animals of group 4 and following the 10th week post-vaccination. Those ani-

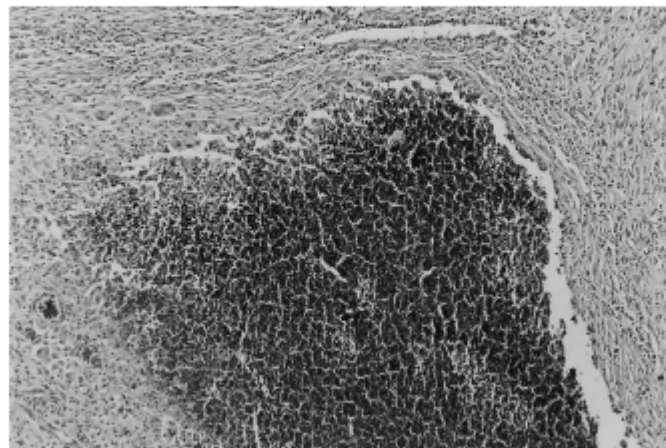


Fig. 4. Subcutaneous tissue of a rabbit inoculated with *P. insidiosum* and necropsied after eight doses of mixed immunotherapeutic. There is a focally extensive area of necrosis surrounded by macrophages, lymphocytes, plasma cells, scarce eosinophils, multinucleated giant cells and proliferated fibrous connective tissue. HE. Objective 10 \times .

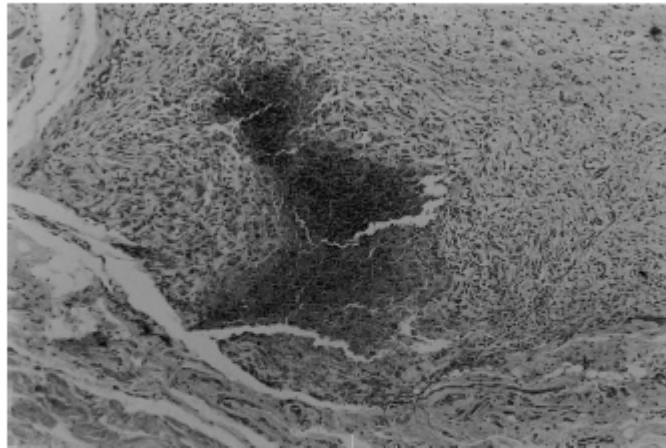


Fig. 5. Subcutaneous tissue of a rabbit inoculated with *P. insidiosum* and necropsied after eight doses of sonicated immunotherapy. There is a small central area of necrosis surrounded by macrophages, plasma cells and proliferated fibrous connective tissue. HE. Objective 10 \times .

mals had a continuous decrease in size of lesions ($P < 0.05$) reaching the average of -71% of the initial area. Also in animals of group 4, a complete remission of lesions was observed in two rabbits there was an increase in the size of lesions over the period of vaccination. Animals of group 2 (sonicated) reached an average increase of 211.8% in the lesions after 26 weeks of observation and eight doses of immunotherapy. The average increase in group 2 was not different to that of group 1 ($P < 0.05$). The histopathology

of the subcutaneous tissue of the rabbits inoculated with *P. insidiosum* and necropsied after eight doses of placebo or immunotherapy protocols (mixed and sonicated) showed typical lesions of pythiosis varying in severity. There were irregular areas of eosinophilic necrosis with intralésional profiles of *P. insidiosum* hyphae and surrounded by eosinophils, macrophages, epithelioid cells, multinucleated giant cells, a few heterophils, and marked proliferation of fibrous connective tissue (Figs. 3–5). In the rabbits cured

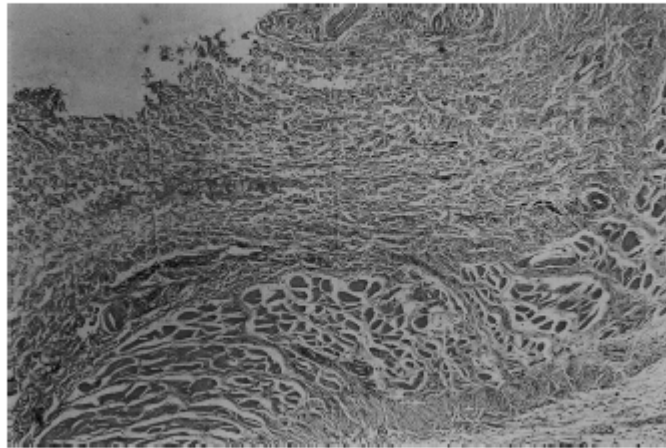


Fig. 6. Normal subcutaneous tissue (site of inoculation) of a rabbit inoculated with *P. insidiosum* and necropsied after eight doses of vortexed immunotherapy. HE. Objective 4 \times .

(group 4) by the vortexed immunotherapeutic, microscopic lesions were not observed at the site of inoculations (Fig. 6).

4. Discussion

Several kinds of immune therapy were developed for fighting against clinical pythiosis in horses in the end of the 20th century [13,15]. All of them using *P. insidiosum* cultures and antigens obtained either from the sonicated fungus or from proteins of mycelium mass filtered or vortexed. Major difference in the immunotherapeutics reported here is the lyophilization stage. Our lyophilized immunotherapeutics have an expiration date of more than a year at room temperature after manufacture [15], whereas previous immunotherapeutics were stored at 4°C until use. According to Miller [12] the mechanism of immune therapy against pythiosis would be based in the exposition of soluble antigens not expressed in the natural active infection. Infection by zoospore fungus *P. insidiosum* would lead the animal body to a response with only a massive mobilization of eosinophils and macrophages provoking the formation of “kunkers”. “Kunkers” have eosinophils covering hyphae and protecting them from being attacked by the cellular immune system in turn preventing regression of the granulomatous structure [12]. Similar findings to the one above occurred in rabbits of this experiment but without “kunkers”. Our findings were the same ones described by Miller and Campbell [14] what allowed us to infer rabbits are good models for studying clinical pythiosis. Besides this, an experimental inoculation of *P. insidiosum* was never successfully obtained in equine or any other species with exception of rabbits. Later on, Mendoza et al. [11] testified the induction of the production of two other dominant proteins using Western blot: 32, 30 and 28kDa. Also, they found a persistence of antibody against those proteins for an extended period of time in horses following a successful vaccination [3]. It seems still not very consistent the finding of three different dominant proteins being the cause of protection because of results in our recent work that showed no one of those dominant proteins [9]. On the other hand, Pinto et al. [19] took an important step to clarify the mechanisms for selection of immunogenic compounds to protect against fungi infection. The work with epitopes from fungal plasma membrane of murine paracoccidiodomycosis induced T cell proliferation in the host. From that, they started to produce a DNA immunotherapeutic from a specific gene cloned. In our immune therapy protocols we do not know yet what are the specific antigens inducing the effective response. Analogous results related to efficiency of vortexed immunotherapeutic were originated by Pal et al. [18] with protocols of vortexed and sonicated vaccines using membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* in mice. Our immunotherapeutic model proposed for group 4 has been effective according to other tests developed. Such findings were seen in equines naturally infected by

P. insidiosum and regardless the age and size of lesion [15].

References

- [1] Bissonnette KW, Sharp NJH, Dykstra MH, Robertson IR, Davis B, Padhye AA, et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. *J Med Vet Mycol* 1991;29:39–44.
- [2] De Cock AWAM, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. Nov., the etiologic agent of pythiosis. *J Clin Microbiol* 1987;25(2):344–9.
- [3] Dixon DM, Casadevall A, Klein B, Mendoza L, Travassos LR, Deepe Jr GS. Development of immunotherapeutics and their use in the prevention of fungal infections. *Med Mycol* 1998;36:57–67.
- [4] Dykstra MJ, Sharp NJH, Olivry T, Hillier A, Murphy KM, Kaufman L, et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. *Med Mycol* 1999;37:427–33.
- [5] Imwikhaya P. Systemic fungal infections in Thailand. *J Med Vet Mycol* 1994;32:395–9.
- [6] Imwikhaya P. Mycotic keratitis in Thailand. *J Med Vet Mycol* 1995;33:81–2.
- [7] Larsson CE, Men MC, Nahas CR, Michalany NS, Newton J, Rosa PS, et al. Pitiose canina—aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. In: Proceedings of the XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1997. p. 155.
- [8] Meireles MCA, Rist-Correa F, Fischman O, Zambrano AH, Zambrano MS, Ribeiro GA. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses* 1993;36:139–42.
- [9] Leal AI. *Pythium insidiosum*: antigenic characterization preliminary and evaluation of adjuvant in the induction of serological response in rabbits. MS dissertation (PpGMV), Federal University of Santa Maria, 1999. 94 p.
- [10] Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. *Mycopathologia* 1986;94:123–9.
- [11] Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med* 1996;6(4):151–4.
- [12] Miller RI. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. *Aust Vet J* 1981;57:377–82.
- [13] Miller RI, Campbell RSE. Immunological studies on equine phycomycosis. *Aust Vet J* 1982;58:227–31.
- [14] Miller RI, Campbell RSE. Experimental pythiosis in rabbits. *Sabouraudia* 1983;21:331–41.
- [15] Monteiro AB. Immunotherapy of equine pythiosis: testing the efficacy of a biological and evaluation of the leukocytic response to the treatment in horses naturally infected with *Pythium insidiosum*. MS dissertation (PpGMV), Federal University of Santa Maria, 1999. 55 p.
- [16] Santurio JM, Leal AI, Leal ABM, Alves SH, Lubeck I, Griebeler J. Teste ELISA para o diagnóstico de Pitiose. In: Proceedings of the Third Congress of Brazil Mycology vol. 3, 2001; Brazil. p. 126.
- [17] Santurio JM, Monteiro AB, Leal AI, Kommers GD, Sousa RS, Cato JB. Cutaneous pythiosis insidiosa in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia* 1998;141:123–5.
- [18] Pal S, Theodor I, Peterson EM, Maza LM. Immunization with the *Chlamydia trachomatis* pneumonitis major outer membrane protein can elicit a protective immune response against a genital challenge. *Infect Immun* 2001;69(10):6240–7.
- [19] Pinto AR, Pucci R, Diniz SN, Franco MF, Travassos LR. DNA-based vaccination against murine paracoccidiodomycosis using the *gp43* gene from *Paracoccidiodomycosis brasiliensis*. *Vaccine* 2000;18:3050–8.
- [20] Suthapattayong B, Leechaiakul P, Prachakarn R, Atichartakam V, Sriphojanant S, Trainorvankul P, et al. Human pythiosis associated with Thalassemia hemoglobinopathy syndrome. *J Infect Dis* 1989;159(2):274–80.

DISCUSSÃO

A imunoterapia é uma ferramenta terapêutica muito utilizada em vários campos da medicina, inclusive, com testes iniciais, para controle de algumas neoplasias em humanos.

Epidemiologicamente a pitiose está relacionada aos ambientes alagados em função da multiplicação do agente *Pythium insidiosum* ocorrer na água. Por isso regiões como o pantanal brasileiro e campos de cultivos de arroz do sudeste asiático a doença ser muito prevalente. No primeiro local atacando eqüinos e nos campos de cultivo em humanos que ficam parcialmente imersos nas águas das lavouras a repicarem mudas de arroz. Não existem relatos de pitiose humana no pantanal brasileiro, provavelmente devido aos hábitos dos habitantes da região, onde as pessoas quase não têm contato direto com a água de córregos e lagoas. Não existem lavouras na região e a imersão na água é evitada devido à presença de piranhas (OBSERVAÇÃO PESSOAL).

Diversos processos de produção de imunoterápicos foram desenvolvidos para combater a pitiose clínica em eqüinos no final do século XX (MILLER, 1981, MENDOZA *et al.* 1986, MONTEIRO, 1999). Esses processos foram desenvolvidos utilizando-se metodologias distintas para a liberação dos antígenos de *Pythium insidiosum* que modificam a resposta imune dos animais infectados. Um método utilizado foi o de sonicação das hifas cultivadas em caldo Sabouraud, com auxílio de disruptor ultra sônico de células (MILLER, 1981; MENDOZA *et al.*, 2003); outro método foi a utilização das proteínas solúveis retiradas de filtrado da massa micelial (MENDOZA *et al.*, 1992a) e um terceiro método com a maceração ou liquidificação das hifas sob cultivo em caldo Sabouraud, seguida de extração dos antígenos através de éter sulfúrico, filtragem do produto macerado e secagem por liofilização (MONTEIRO 1999). A inovação positiva em relação aos protocolos de vacinas de Miller (1981) e Mendoza (1992a), está em que os produtos testados neste experimento foram liofilizados, ficando os imunoterápicos com prazo de validade acima de 1 ano, além do processo de liberação de imunogênicos ocorrerem a partir da massa micelial macerada ou liquidificada. Normalmente, a produção de um imunoterápico requer a mais segura e correta identificação do agente imunogênico. Neste caso do imunoterápico, produzido no LAPEMI/UFES, tem-se a certeza absoluta de que nos processos de fabricação foi

utilizado um isolado de *P. insidiosum* a partir de um potro com pitiose clínica no município de Jaguari, RS. A cultura utilizada teve sua identificação confirmada deste isolado no “Centraalbureau voor Schimmelcultures - CBS” da Holanda, recebendo o registro CBS 101555 (anexo 1). Recentemente Shurko *et al.*, (2003), utilizaram este isolado CBS 101555 para estudar as diferenças moleculares entre cepas de *P. insidiosum* originárias da Ásia, Austrália e Américas. O isolado em CBS 101555 mostrou, nesta publicação, o mesmo perfil molecular de isolados de eqüinos da Costa Rica e Estados Unidos.

De acordo com Miller (1981) o mecanismo de ação dos imunoterápicos contra pitiose estaria baseado na exposição de antígenos estimulantes de resposta a base de anticorpos solúveis e complemento que, na infecção ativa, normalmente não seriam expressos. Conforme este autor, a infecção natural pelo oomiceto *P. insidiosum*, induziria o hospedeiro a engendrar uma resposta maciça mobilização de eosinófilos, provocando, então, a formação de “kunkers”. Os “kunkers” são uma capa esinofílica que protege as hifas do ataque da imunidade celular e impedindo a regressão da estrutura granulomatosa. As afirmativas de Miller (1981) foram confirmadas, de maneira detalhada por Mendoza *et al.* (2003), onde estes autores afirmam que a resposta alternativa à doença pelo imunoterápico seria o estímulo à produção de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), mobilizadores de células mononucleares da resposta imune, principalmente macrófagos, linfócitos além da substância interleucina 2 (IL2), em vez da resposta clássica do organismo animal à infecção natural ao *Pythium*, composta por linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) com a mobilização de eosinófilos e mastócitos, induzindo somente ao desenvolvimento de “kunkers”. Esta afirmativa foi confirmada na histopatologia das lesões dos coelhos inoculados com *Pythium insidiosum*, neste trabalho. Nos grupos 3 e 4 (os coelhos em processo de cura que recebiam imunoterápico misto e macerado, respectivamente) foram detectados junto ao foco de necrose a presença maciça de macrófagos, linfócitos, células plasmáticas, células gigantes e escassos eosinófilos. A resposta imune eficiente ao ataque de fungos e oomicetos é realmente através de linfócitos T auxiliares, estimulados principalmente por antígenos oriundos de epitopos da membrana fúngica. Quem deu passo importante no esclarecimento destes mecanismos imunológicos que corrobora os dados da frase anterior, foram Pinto *et al.* (2000) que permitiram a fabricação de vacina contra o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* ao trabalharem com paracoccidioidomicose murina. Estes

autores descobriram a existência, na membrana do *Paracoccidioides brasiliensis*, de uma proteína antigênica denominada GP 43, que realmente induz resposta imune consistente contra a paracoccidioidomicose.

Por outro lado, ao se observar a tabela 2 ficam dois questionamentos, pois os dados de eficiência dos imunoterápicos em eqüinos apresentados por Miller (1981) e Mendoza *et al.* (1992a) e Mendoza *et al.* (2003) em cães, não foram satisfatórios. E que os dados em eqüinos vacinados com imunoterápico contra *Pythium*, avaliados por Monteiro (1999), foram satisfatórios com 83% de cura. Primeira pergunta: Se o imunoterápico realmente modifica a resposta imune, conforme a hipótese de Mendoza *et al.* (2003), porque os índices de cura foram tão baixos? Segunda pergunta: Porque o imunoterápico desenvolvido no LAPEMI e testado por Monteiro (1999) foi muito mais eficaz que os demais?

A resposta para estas perguntas está no experimento agora mostrado nesta tese, ou seja, o experimento que avaliou 3 processos diferentes de exposição dos antígenos mostrou de forma inequívoca que a raiz do problema está no processo de sonicação que desnatura os antígenos citoplasmático que irão provocar uma modificação na resposta imune do animal. Isto confirma os resultados de baixa eficiência do imunoterápico desenvolvido por Miller *et al.* (1981) onde foram liberados os antígenos através de sonicação. O imunógeno desenvolvido por Mendoza *et al.* (1992a), não mostrou eficiência devido a sua constituição a base de antígenos solúveis diluídos no meio de cultivo. Conforme ficou demonstrado por Pinto *et al.* (2000), os antígenos que induzem proteção estão na membrana e no citoplasma, necessitando, então, que as hifas sejam rompidas e os antígenos separados. Os processos de sonicação podem, devido a sua elevada frequência sônica, provocar a desnaturação de proteínas de *P. insidiosum* e, entre elas, os antígenos que provocam a resposta diferenciada (PAL *et al.* 2001). Isto pode explicar o melhor desempenho do IMT PitiumVac, produzido no LAPEMI/UFSM. Nos nossos protocolos de imunoterapia ainda não sabemos quais os antígenos específicos que induziria uma resposta efetiva, pois a constatação de que 3 antígenos dominantes seriam a fonte de proteção ainda é pouco consistente; mas, em razão dos resultados ruins do grupo 2 (coelhos que receberam imunoterápico sonicado), eles seriam desnaturados pelo uso da sonicação. No entanto, quando o micélio foi inativado com éter sulfúrico e macerado através de liquidificação, não houve desnaturação de antígenos, como indicam os resultados dos grupos 3 e 4, onde o grupo 4, após 8 doses

com intervalo de 14 dias entre aplicações, (coelhos que receberam o imunoterápico macerado ou liquidificado) este grupo 4, mostrou-se mais eficiente em controlar a infecção dos coelhos. Resultados semelhantes, em relação eficiência da vacina liquidificada, foram encontrados por Pal *et al.* (2001) ao utilizarem protocolos com vacinas sonicadas e maceradas em camundongos a partir de proteínas de membrana de *Chlamydia trachomatis*. O processo de liquidificação resulta num IMT que tem mostrado efetividade em outros testes desenvolvidos, principalmente em eqüinos naturalmente infectados por *Pythium insidiosum*, com lesões de qualquer tamanho ou idade (OBSERVAÇÃO PESSOAL).

Quadro de semelhante eficiência se repetiu nos coelhos deste experimento, mesmo sem a presença de “kunkers”. As mesmas lesões foram também encontradas por Miller e Campbell (1983). Isto permite confirmar que os coelhos se constituem em bons modelos para estudo da pitiose. Ademais, ainda não se conseguiu a doença experimental em eqüinos ou qualquer outro animal, com exceção de coelhos.

Por outro lado, a importante publicação de Shurko *et al.*, no ano de 2003, levanta um novo questionamento sobre a etiologia da pitiose em diferentes continentes. Ficaram demonstradas as diferenças genéticas entre os isolados de *P. insidiosum*, ou seja, as grandes diferenças entre os isolados inferem a uma conclusão de que, no mínimo, possam existir algumas variedades ou sub-espécies de *P. insidiosum*; e não seria demasiado afirmar que existam outras espécies de *Pythium* produzindo o quadro clínico da pitiose em animais e humanos nos diversos continentes.

Os dados gerados nesta tese podem inferir que, no futuro, novas perspectivas se abrem para o estudo da pitiose e seu controle. Pode-se destacar que o aperfeiçoamento da imunoterapia com o uso de uma padronização de procedimentos em sua produção, ou seja, ruptura das hifas de *P. insidiosum* cultivadas, através de maceração por liquidificação e posterior precipitação das proteínas com éter sulfúrico, seguida de liofilização, são os primeiros passos que sedimentam a busca de novas perspectivas. O nosso plano de pesquisa almeja que, nos anos futuros, ocorra a descoberta dos antígenos específicos que realmente induzam à resposta imune diferenciada, onde a cura ocorra em no mínimo 95% dos animais doentes e submetidos à imunoterapia. Outro objetivo que será buscado é o aperfeiçoamento dos estudos sobre a resposta imune dos animais com pitiose clínica. Deste entendimento virá, com certeza, a produção de uma vacina e não apenas de um imunoterápico, que capacitará os animais para uma proteção preventiva da doença por um determinado período de tempo.

CONCLUSÕES:

1. Dentre os processos de produção de imunoterápicos contra a pitiose equina, o único realmente eficiente foi o macerado, onde houve uma diminuição da área das lesões em 71,8% ($P < 0.001$), sendo que 2 coelhos ficaram completamente curados da pitiose inoculada em 26 semanas de avaliação.
2. Histologicamente não houve diferenças no quadro da resposta inflamatória entre os processos de imunoterapia testados, havendo somente regressão das lesões no grupo com imunoterápico macerado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W., BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996. Cap. 23: Phylum Oomycota, p. 683-737.
- 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.; BOETTCHER, C.S.; LEAL, A. T.; LEAL, A. M.; SILVA, J. E. P.; SANTURIO, J. M. Aplicação do “ELISA-conta” no diagnóstico da pitiose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.33, n.3, p.155-157, 2001.
- AUSTWICK, P. K. C., COPLAND, J. W. Swamp cancer. **Nature**. p. 250-284,1974.
- BENTINCK-SMITH J., PADHYE A. A., MASLIN W. R., HAMILTON C, MCDONALD R. K., WOODY B. J. Canine pythiosis-isolation and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, p. 295-298, 1989.
- BISSONNETTE, K. W., SHARP; N. J. H.; DYKSTRA, M. H.; ROBERTSON, I. R.; DAVIS B.; PADHYE, A. A.; KAUFMAN, L. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**,v.29, p.39-44, 1991.
- BRIDGES, C. H.; EMMONS, C. W. A phycomycosis of horse caused by *Hyphomyces destruens*. **Journal of American Veterinary Medical Association**. V.38, 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., McCLURE, J. J.; TRICHE, P.; CROWDER, C. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. **American Journal of Veterinary Research**. v. 49, n. 11, p. 1866-1868, 1988.
- 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.
- CONNOLE, M. D. Equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 49, p. 214-215, 1973.
- CORLISS, J. O. An interim utilitarian ("user friendly") hierarchical classification and characterization of the Protista. **Acta Protozoologica**. V.33, p.1-51, 1994.
- DE COCK, A. W. A. M., MENDOZA, L., PADHYE, A. A.; AJELLO, L.; KAUFMAN L. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.
- DE HAAN J., HOOBKAMER L. J. Hyphomycosis destruens. **Veeartsenijkundige bladen voor Nederlansh-Indië**. V.13, p.350-374, 1901.
- DROUIN, V. Sur une nouvelle mycose du cheval. **Récueil de Médecine Vétérinaire**. v.3, p.337-344, 1896.
- DYKSTRA, M. J.; SHARP, N. J. H.; OLIVRY, T.; HILLIER, A.; MURPHY, K. M.; KAUFMAN, G. A.; KUNKLE, G. A.; PUCHEU-HASTON, C. 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.
- EMMONS, C. W. Phycomycosis in man and animals. **Riv Patol Vegetable**. v. 4, p. 329-337, 1964.
- ENGLISH, P. B., FROST, A. J. Phycomycosis in a dog. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 291-292, 1984.
- FISCHER, J. R., PACE, L. W., TURK, J. R. KREEGER, J. M., MILLER, M. A., GOSSNER, H. S. Gastrintestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 6, p. 380-382, 1994.
- FOIL, C. S. O.; SHORT, B. G.; FADOK, V. A.; KUNKLE, G. A. 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. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**. p. 57-63, 1996.
- 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.; LEISE, B. S.; LOPEZ, M. K.; GEE, M. K.; O'REILLY, K. L. 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.; WHITTINGTON A.; LOPEZ, M. K., BORROUGHS, M. N.; ROY, A. F. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. V.14, p.288-294, 2002.
- GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. V.33, p.695-720, 2003.
- GONZÁLES, H. E., TRHEEBILCOK, E., MONTAÑO, J., LEÓN, J. V. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. **Revista ICA**. v. 14, n. 2, p. 115-122, 1979.
- HEADLEY, S. A., ARRUDA, H. N. Jr. Equine cutaneous pythiosis: a report of four cases. **Ciência Rural**. v. 34, n. 1, p.289-292, 2004.
- HEALTH, J. A.; KIEHN, T. E.; BROWN, A. E.; LAQUAGLIA, M. P.; STEINHERZ, L. J.; BAERMAN, G.; WONG, M.; STEINHERZ, P. G. *Pythium insidiosum* pleuropericarditis complicating pneumonia in a child with leukemia. **Clinical Infectious Diseases**. v.35, p.e60-64, 2002.
- 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.
- HENDRIX, J. W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**. V.144, p.1028-1029, 1964.
- 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 Mycology Society of Japan**. v. 21, p. 263-265, 1980.
- IMWIDTHAYA, P. Systemic fungal infections in Thailand. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 32, p. 395-399, 1994a.
- IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**. v. 70, p. 558-560, 1994b.
- IMWIDTHAYA, P. Mycotic keratitis in Thailand. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**. v. 33, p. 81-82, 1995.
- JAEGER, G. H.; ROTSTEIN, D. S.; LAW, J. M. Prostatic pythiosis in a dog. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.16, p.598-602, 2002.
- 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.
- KRAJAEJUM, T.; KUNAKORN, M.; NIEMHOM, S.; CHONGTRAKOOL, P.; PRACHARKTAM, R. 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.
- KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infections Diseases**, Suppl 1: 1-7, 1994.
- LARSSON, C. E.; MENG, M. C.; NAHAS, C. R.; MICHALANY, N. S.; NEWTON, J.; ROSA, P. S.; BONAVIDO, D.; GAMBALE, W.; SOARES, E. S. Pitiose canina –

Aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, XXV, Gramado. **Anais...**, Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997. p.155.

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

LEAL, A. B. M.; LEAL, A. T.; SANTURIO, J. M.; KOMMERS, G. D.; CATTO, J. B. Pitiose equina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 21, n.4, p.151-156, 2001.

LEAL, A.T., SANTURIO, J. M.; LEAL, A. B. M.; PINTO, A. M.; GRIEBELER, J.; FLORES, E. F.; FERREIRO, L.; CATTO, J. B. Resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium insidiosum* associados a diferentes adjuvantes. **Ciência Rural.** v. 32, n. 6, p.1027-1032, 2002.

LILJEBJELKE, K. A.; ABRAMSON, C.; BROKUS, C.; GREENE, C. E. 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.

MACDONALD, E.; MILLWARD, L.; RAVISHANKAR, J. P.; MONEY, N. P. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology.** v.37, p.245-249, 2002.

McMULLAN, W. C., JOYCE, J. R., HANSELKA, D. V.; HEITMANN, J. M. 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., RIET-CORREA, F., FISCHMAN, O.; ZAMBRANO, A. F. H.; ZAMBRANO, M. S. 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., 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., MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* de Cock *et al.* 1987 and its synonym *Pythium destruens* Sipton 1987. **Mycoses.** v. 32, n. 2, p. 73-77, 1989.
- MENDOZA, L., VILLALOBOS, J., CALLEJA, C. E. SOLIS A. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosum in horses. **Mycopathologia.** v. 119, p. 89-95, 1992a.
- 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, 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 Medicale.** v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

- MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; MANDY, W.; GLASS, R. 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.
- MILLER, P.M. V8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. **Phytopathology**. v.45, p.461-462, 1955.
- 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.
- MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Immunological studies on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, p. 227-231, 1982b.
- 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. Gastrintestinal 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. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**. v. 21, p. 331-341, 1983.
- MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Hematology of horses with phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. V.60, p.28-29, 1983b.

- 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***. Santa Maria: UFSM, 1999. 52 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 1999.
- MOORE-LANDECKER, J. **Fundamentals of the Fungi**. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, Inc. 1996. Cap. 3: Zoosporic fungi, p. 33-79.
- MORTON, L. D., MORTON, D. G., BAKER, G. J.; GELBERG, H. B. Chronic eosinophilic enteritis attributed to *Pythium* sp. in a horse. **Veterinary Pathology**. v. 28, p. 542-544, 1991.
- MURDOCH, D., PARR, D. *Pythium insidiosum* keratitis. **Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology**. v. 25, n. 2, p. 177-179, 1997.
- MURRAY, D. R., LADDS, P. W., JOHNSON, R. H.; POTT, B. W. Metastatic phycomycosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 172, n. 7, p. 834-836, 1978.
- 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.

- PAL S.; THEODOR, I.; PETERSON E. M.; MAZA L. M. Immunization with the *Chlamydia trachomatis* pneumonitis major outer membrane protein can elicit a protective immune response against a genital challenge. **Infection and Immunity**. p.6240-47, 2001.
- PATTON, C. S., HAKE, R., NEWTON, J. TOAL, R. L. Esophagitis due to *Pythium insidiosum* infection in two dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 10, n. 3, p. 139-142, 1996.
- PINTO, A. R.; PUCCIA, R.; DINIZ, S. N.; FRANCO, M. F.; TRAVASSOS, L. R. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**. v.18, p.3050-3058, 2000.
- PURCELL, K. L., JOHNSON, P. J., KREEGER, J. M.; WILSON, D. A.. 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.
- RAVISHANKAR, J. P.; DAVIS, C. M.; DAVIS, D. J.; MACDONALD, E.; MAKSELAN, S. D.; MILLWARD, L.; MONEY, N. P. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v.34, p.161-175, 2001.
- RECH, R. R., RODRIGUES A., KRAUSPENHAR C., BARROS C. S. L., GRAÇA D. L. Pitiose colônica em um cão.In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, XXIII Brasília,Divulgação eletrônica. **Anais...** 2002.
- REIS, J. L. Jr.; CARVALHO, E. C. Q.; NOGUEIRA, R. H. G.; LEMOS, L. S.; MENDOZA, L. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**. V.96, p.289-295, 2003.
- RIET-CORREA, F., FERREIRA, J. L. M., SCHILD, A. L. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico- UFPEL**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 1998, 55 p.

- RODRIGUES, C. A.; LUVIZOTTO, M. C. R. Zigomicose e pitiose cutânea em equinos: diagnóstico e tratamento. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**. v.3, n.3, p.03-11, 2000.
- 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. **Anais...**, 1999, p. 151.
- SALLIS, E. S. V., PEREIRA, D. I. B., RAFFI, M. B. Pitiose cutânea em equinos: 14 casos. **Ciência Rural**. v. 33, n. 5, p.899-903, 2003.
- SANAVRIA, A.; FABRIS, V. E.; CAMPOS, S. G.; PEIXOTO, P. F. V., MORAIS, M. C.; FERNANDES, C. G. N. Pitiose em equinos: 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, **Pesquisa Agropecuária Brasileira - Série Veterinária**. v. 9, p. 7-8, 1974.
- SANTOS, M. N.; METZDORF, L. L.; BRAGA, M. M., WOLLE, C. A. Pitiose cutânea em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.7, p.57-61, 1987.
- SANTURIO, J.M; LEAL, A.T.; MONTEIRO, A. B. Pythiose. In: LEFÈVRE, P.C; BLANCOU, J.; CHERMETTE, R. **Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires du Bétail – Europe et Régions Chaudes**. Paris: Editions TEC & DOC et Editions Médicales Internationales, 2003. v.2. Cap.100. p.1231-1241.
- SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, A. B.; LEAL A.T.; KOMMERS G. D.; DE SOUSA R.S.; CATTO J.B. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**. v. 141, p 123-125, 1998.

- SANTURIO, J.M.; LEAL, A.T.; LEAL, A.B.M.; ALVES, S.H.; LUBECK, I.; GRIEBELER, J. Teste ELISA para o diagnóstico de Pitiose. In: Congresso Brasileiro de Micologia III. **Anais...** Águas de Lindóia, SP, Brasil 2001, p.126
- SATHAPATAYAVONGS, B.; LEELACHAIKUL P.; PRACHAKTAM R.; ATICHARTAKARN V.; SRIPHONANART S.; TRAIRATVORAKUL P.; JIRASIRITHAM S.; NONTASUT S.; EURVILAICHIT C.; FLEGEL T. Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. **Journal of Infectious Diseases.** v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.
- SCHURKO, A.; MENDOZA, L.; DE COCK, A. W. A. M.; KLASSEN, G. R. 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, 2003.
- SEDRISH, S. A., MOORE, R. M., VALDES-VASQUES, M. A., HAYNES, P. F., VICEK, T.. 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 marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. **European Journal of Epidemiology.** v. 8, n. 3, p. 427-432, 1992.
- SHENEP, J. L., ENGLISH, B. K., KAUFMAN, L., PEARSON, T. A., THOMPSON, J. W., KAUFMAN, R. A., FRISCH, G., RINALDI, M. G. 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.
- SILVA R. A., AROSEMENA N. A., HERRERA H. M, SAHIB C. A., FERREIRA M. S. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology.** v. 60, n 1-2, p. 167-171, 1995.
- SMITH, F. The pathology of bursattee. **Veterinary Journal.** v.19, p.16-17, 1884.

- TABOSA, I. M., MEDEIROS, V. T., DANTAS, A. F .M.; AEVEDO, E. O., MAIA, J. C. Pitiose cutânea em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 51, nº 1, p 27-30, 1999.
- THITITHANYANONT, A., MENDOZA, L., CHUANSUMRIT, A. PRACHARKTAM R.; LAOTHAMATAS J.; SATHAPATAYAVONGS B.; LOLEKHA S.; AJELLO L. 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.
- 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 equinos no Estado do Pará. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, XXV, Gramado. **Anais...**, Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997. p.150

ANEXOS

Data from CBS Fungi database

CBSnr	101555
Name	<i>Pythium insidiosum</i> de Cock <i>et al.</i>
Isolated from	abdomen of horse, granulomatous lesion
Location	Brazil, South Region
Isolated by	J.M. Santurio, Laboratorio de Micologia Veterinaria, Universidade Federal de Santa Maria, No. DMVP 118/98, Sep 1998
Identified by	A. de Cock
Deposited by	J.M. Santurio
Date of accession	Dec 1998
Preservation	AG (6 mo),LN,LY,MO
Restrictions	H2
Supply	Active

Comments or additions please to: www@cbs.knaw.nl

Date: December
26, 2003

© 2003 - Centraalbureau voor Schimmelcultures - www.cbs.knaw.nl - info@cbs.knaw.nl

Anexo 1: Descrição do registro da cepa de *Pythium insidiosum*, utilizada para fabricação dos imunoterápicos avaliados.

Anexo 2: Medidas da lesões granulomatosas de coelhos inoculados com zoósporos de *P. insidiosum* submetidos a diferentes IMT.

Semana	Placebo								Imunoterápico Sonicado								Imunoterápico Misto								Imunoterápico Macerado							
	Coelho (área nódulos cm ²)					Média	%	Coelho (área nódulos cm ²)					Média	%	Coelho (área nódulos cm ²)					Média	%	Coelho (área nódulos cm ²)					Média	%				
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	5			1	2	3	4	5			1	2	3	4	5						
0*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	--	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	--	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	--	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	--				
1** [£]	11.5	21.7	17.6	16.0	24.7	18.3	0.00	11.4	21.1	9.9	5.7	10.5	11.7	0.0	21.7	2.5	15.8	14.0	4.5	11.7	0.0	3.2	3.6	3.3	3.6	50.0	3.4	0.00				
2***	22.5	8.1	29.1	19.3	37.8	23.4	27.6	12	25.8	12.8	6.0	11.5	13.6	16.1	21.0	5.5	15.8	3.5	2.0	9.5	-18.3	3.2	3.6	5.7	2.0	Morreu*	3.6	6.2				
3	23.9	5.2	27.0	15.2	36.0	21.5	17.3	9.6	28.8	7.7	3.8	7.5	11.5	-2.0	13.1	2.5	17.5	15.0	5.0	10.6	-9.2	4.0	3.2	4.3	3.2		3.7	7.4				
4 [£]	30.2	14.0	30.6	20.6	35.3	26.1	42.8	14.6	31.9	12.4	6.7	6.0	14.3	22.1	16.4	4.8	18.5	18.4	5.0	12.6	7.9	4.5	3.6	8.9	2.0		4.8	38.0				
5	37.1	17.2	35.4	29.7	36.5	31.2	70.3	9.3	41.4	19.5	5.5	7.7	16.7	42.2	17.2	3.9	20.0	24.9	2.0	13.6	16.2	4.5	8.7	6.3	3.2		5.7	64.9				
6	42.8	14.6	28.1	30.6	34.8	30.9	64.8	7.5	41.4	23.3	5.3	9.3	17.4	48.0	28.1	3.5	16.3	24.5	2.5	14.9	28.0	3.0	6.5	6.2	3.2		4.7	37.3				
7 [£]	46.9	20.5	28.0	35.1	39.0	33.9	85.2	6.9	45.5	26.4	2.5	10.5	18.4	56.5	25.4	2.5	15.0	27.0	2.5	14.5	23.9	1.2	8.7	5.0	3.2		4.5	31.9				
8	54.0	11.5	28.1	25.5	34.4	30.7	67.6	3.3	40.2	33.0	2.5	7.2	17.2	47.0	25.3	5.7	18.4	30.7	2.5	16.5	41.2	1.2	3.8	5.0	3.5		3.4	-1.8				
9	58.4	12.0	11.2	21.6	33.0	27.2	48.8	2.9	40.7	30.6	5.7	3.2	16.6	41.7	17.2	5.5	13.2	21.3	1.3	11.7	0.1	1.2	9.6	5.0	3.6		4.7	40.9				
10 [£]	56.9	10.5	11.9	29.0	56.1	32.8	79.6	4.6	43.4	32.4	6.4	8.1	19.0	61.9	25.0	6.2	16.8	26.1	1.0	15.0	28.3	1.6	6.7	4.6	3.6		4.1	19.6				
11	60.8	11.4	9.8	27.0	51.0	32.0	74.8	1.2	45.2	27.5	7.8	4.8	17.3	47.6	22.9	5.7	12.8	25.3	2.0	13.5	16.0	1.4	3.8	1.9	2.2		2.3	-31.9				
12	67.9	9.6	11.5	25.8	63.0	35.6	94.2	4.4	52.5	36.0	7.5	3.7	20.8	77.6	24.7	5.7	22.0	24.0	1.0	15.4	32.4	1.0	3.5	0.4	1.0		1.5	-57.1				
13 [£]	76.4	9.0	18.0	37.7	45.1	37.2	103.4	5.3	90.0	60.6	2.0	3.5	32.3	175.2	32.1	6.7	20.0	21.6	0.0	16.1	37.5	1.3	2.4	0.0	1.9		1.4	-59.1				
14	68.2	2.1	13.2	29.1	52.7	33.1	80.6	4.0	61.6	46.2	3.2	2.4	23.5	100.2	34.7	6.6	13.1	29.7	0.0	16.8	43.7	1.0	1.5	0.0	0.8		0.8	-76.1				
15	72.9	2.9	11.5	19.3	46.6	30.6	67.4	2.9	60.8	57.6	2.4	1.2	25.0	112.9	25.5	4.2	11.5	27.0	0.0	13.6	16.6	1.0	2.5	0.0	1.1		1.1	-66.5				
16 [£]	73.6	3.8	14.0	7.8	54.3	30.7	67.7	3.2	59.2	63.2	2.1	0.9	25.7	119.3	21.6	4.0	12.4	32.4	0.0	14.1	20.3	1.0	2.2	0.0	1.1		1.1	-68.9				
17	71.4	4.4	21.1	5.1	64.5	33.3	81.9	3.0	54.0	68.8	1.3	1.4	25.7	119.2	22.0	2.9	15.2	34.5	0.0	14.9	27.5	1.0	1.6	0.0	1.0		0.9	-74.2				
18	90.2	2.5	25.5	8.1	79.2	41.1	124.5	3.2	66.4	71.4	1.9	1.6	28.9	146.5	27.2	4.2	16.7	39.0	0.0	17.4	48.9	0.9	1.7	0.0	0.6		0.8	-76.7				
19 [£]	92.7	5.4	15.2	5.7	59.4	35.7	95.0	2.5	79.2	68.4	1.0	1.0	30.4	159.4	32.8	2.2	1.7	35.5	0.0	14.4	23.5	0.6	1.9	0.0	0.8		0.8	-75.3				
20	106.7	4.4	14.0	6.0	50.1	36.2	97.9	3.0	74.7	67.3	1.0	1.0	29.4	150.7	32.0	2.2	1.8	43.6	0.0	15.9	36.1	0.5	1.2	0.0	0.9		0.6	-81.2				
21	80.0	2.7	11.5	7.0	43.5	28.9	58.1	2.2	69.6	75.3	1.2	1.0	29.9	154.7	39.4	1.5	2.7	36.7	0.0	16.1	37.3	0.4	1.4	0.0	1.0		0.7	-79.4				
22 [£]	90.9	2.2	12.5	6.7	52.0	32.8	79.5	2.1	68.0	82.0	3.0	0.7	31.2	165.7	37.3	2.1	3.0	50.7	0.0	18.6	59.1	0.0	1.3	0.0	1.0		0.6	-83.2				
23	84.0	1.8	10.5	6.0	53.5	31.1	70.2	2.2	70.5	81.6	2.4	0.9	31.5	168.8	41.6	2.2	2.8	42.0	0.0	17.7	51.5	0.0	1.4	0.0	1.1		0.6	-81.7				
24	99.6	1.7	8.7	12.6	49.5	34.4	87.9	3.2	73.0	105.0	2.6	0.6	36.9	214.4	45.9	1.8	6.9	53.0	0.0	21.4	84.1	0.0	1.2	0.0	1.2		0.6	-82.5				
25	105.4	1.4	8.4	14.2	47.7	35.4	93.5	2.5	73.1	105.0	2.7	0.7	36.8	213.8	41.9	1.7	9.1	63.7	0.0	23.3	98.9	0.0	2.7	0.0	0.8		0.9	-74.4				
26	103.7	1.4	5.2	10.6	33.3	30.8	68.5	3.4	77.2	105.0	2.5	0.6	37.7	221.8	42.0	1.3	8.6	39.2	0.0	18.2	55.8	0.0	2.9	0.0	1.0		1.0	-71.8				

* semana anterior à inoculação com 17500 zoósporos de *Pythium insidiosum*

**Medidas tomadas dos nódulos 1 mês após a inoculação com zoósporos de *Pythium insidiosum*

*** Medidas tomadas dos nódulos 5 dias após a 1 dose de vacina

****Os dados iniciais retirados do cálculo da média

£ Aplicação de vacina

Anexo 3: Dados bibliográficos do Pedido de Patente nº PI9800054 – Vacina contra pitiose eqüina, produzida no LAPEMI/UFSM e objeto das avaliações nesta tese.



1.8.1.1 CEDIN - Centro de Documentação e Informação tecnológica

1.8.1.2 Dados Bibliográficos da Patente

(21) N° Pedido	PI9800054
(22) Data do Depósito	29/01/1998
() Prioridade	(31) País (32) N° (33) Data
(51/52) Classificação	<u>A61K 35/70</u>
(54) Título	VACINA CONTRA PITIOSE EQUINA
(57) <u>Resumo</u>	Patente de Invenção "VACINA CONTRA PITIOSE EQUINA". Refere-se a uma vacina produzida a partir de cultivos puros do fungo Pythium Insidiosum, contra uma doença granulomatosa de eqüinos de regiões tropicais e sub-tropicais, produzida pela infecção deste fungo no tecido su
(71) Nome do Requerente	Universidade Federal de Santa Maria - UFSM / Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
(72) Nome do Inventor	Janio Moraes Santurio / João Batista Catto
(74) Nome do Procurador	Eliane Oliveira Fernandes Fortes
(86) Número Pct	

Publicações					
Revista		Despacho			Lei
Número	Data	Código	Data	Descrição	Número
1537	20/06/2000	3.6	25/05/2000	Publicação do Pedido Arquivado Definitivamente - Art. 216 § 2º e Art. 17 § 2º da LPI	9.279
1542	25/07/2000	3.7	28/06/2000	Publicação Anulada	9.279
1543	01/08/2000	3.1	13/07/2000	Publicação do Pedido de Patente ou de Certificado de Adição de Invenção	9.279