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

Camila Marina Verdi

Pythium insidiosum: DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO EM OVOS EMBRIONADOS DE *Gallus gallus domesticus*

Santa Maria, RS.
2017

Camila Marina Verdi

Pythium insidiosum: DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO EM OVOS EMBRIONADOS DE *Gallus gallus domesticus*

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

Professor Orientador Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS
2017

Camila Marina Verdi

Pythium insidiosum: DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO EM OVOS EMBRIONADOS DE *Gallus gallus domesticus*

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

Aprovado em 08 de Fevereiro de 2017:

Prof. Dr. Janio Morais Santurio (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Érico Silva de Loreto (SOBRESP)

Dr.ª Maria Isabel de Azevedo (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por dar aos seres humanos sabedoria.

Aos meus pais Amarildo e Rozane, pela paciência, amor, companheirismo e apoio de sempre, incentivando os estudos e a não desistir dos sonhos. A vocês minha eterna gratidão.

Ao meu namorado Eduardo por ter dado início a essa trajetória, pela paciência, apoio, amor e companheirismo em todos os momentos do mestrado, estando ao meu lado principalmente nos mais difíceis. Não tenho palavras para agradecer.

Ao professor Dr. Janio Morais Santurio, por ter "aberto as portas" do laboratório, pelos ensinamentos e por estar realizando um sonho. Professor, serei eternamente grata, obrigada por tudo.

A minha família, meu irmão, meus sogros, minhas cunhadas e cunhado pela amizade e apoio. Vocês foram fundamentais nessa caminhada.

As minhas sobrinhas, Ana Lívia e Lara, obrigada pela alegria que transmitem, por renovar a energia e serem um incentivo. Que a pureza de crianças permaneça em vocês sempre.

Aos meus avós, Lurdes por estar ao meu lado, rezar sempre por mim e ser além de tudo minha amiga. Egídio e Olivia (*in memoriam*) que mesmo não sabendo ao certo o que era mestrado e não estando aqui hoje para presenciar essa conquista, torciam pela realização dos meus sonhos, com certeza hoje vocês estão olhando por mim e dando forças, nunca esquecerei de vocês meus noninhos.

A Fran pela paciência e ajuda, por me guiar e me ajudar em todos os experimentos, não tenho palavras para te agradecer. Você tem minha admiração.

A todos os colegas e amigos que conheci em Santa Maria, principalmente a Pauline, Thaísa e Caroline, obrigada pela amizade, que ela sempre permaneça.

A todos os colegas e amigos do LAPEMI, principalmente à Karine, Laura e Bel pela amizade. Também quero muito agradecer à Juliana e ao Érico, que sempre se mostraram dispostos a me ajudar e dividiram comigo um pouco do seu conhecimento. Vocês foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A professora Patrícia Amaral Gurgel Velasquez, que durante a graduação mostrou o caminho da ciência, fazendo a pesquisa se tornar uma paixão, muito obrigada!

A todos que direta e indiretamente me ajudaram nesses anos, e que tornaram este trabalho possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM.
Meus sinceros agradecimentos!

EPÍGRAFE

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar o contrário. ”

Albert Einstein

RESUMO

Pythium insidiosum: DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO EM OVOS EMBRIONADOS DE *Gallus gallus domesticus*

AUTOR: Camila Marina Verdi
ORIENTADOR: Janio Morais Santurio

Pitiose é uma doença severa causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* que acomete animais e humanos. Se não diagnosticada e tratada rapidamente, essa doença pode levar à morte do indivíduo acometido. O tratamento da pitiose é difícil, visto que ela não responde bem aos fármacos comumente utilizados em doenças fúngicas, devido à ausência de ergosterol na membrana de *P. insidiosum*. Atualmente, pesquisas sobre o tratamento da pitiose utilizam o coelho para reprodução da infecção experimental, uma vez que, este modelo de infecção reproduz doença semelhante a desenvolvida por equinos. Buscando racionalizar o uso de animais em experimentação cientifica, é de grande importância desenvolver modelos alternativos para o desenvolvimento de doença experimental. Nesse contexto, o uso de ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*), em pesquisas com vírus, bactérias e fungos, tem demonstrado ser de fácil manuseio, baixo custo e boa reprodutibilidade, assim como auxilio em estudos de patogenia e descobertas de novos tratamentos e diante disso, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um novo modelo de infecção experimental *in vivo* para pitiose em ovos embrionados de galinha, assim como avaliar a toxicidade de azitromicina, terbinafina e itraconazol. Inicialmente, foram realizados testes para padronização da concentração do inóculo, melhor dia de inoculação e tempo de infecção. Após concluído esse processo foram realizados testes de toxicidade com azitromicina, itraconazol e terbinafina, os quais já haviam demonstrado ação contra *P. insidiosum in vitro*. As concentrações utilizadas para azitromicina foram 0,2 µg/ovo, 1,6 µg/ovo e 12,8 µg/ovo, itraconazol 12,8 µg/ovo e terbinafina 12,8 µg/ovo, sendo administrados 0,025 mL em três intervalos de tempo, 8/8 horas, 12/12 horas ou 24/24 horas. Os resultados mostraram que o melhor dia para indução de infecção foi no 14° dia de desenvolvimento embrionário, utilizando uma concentração de 500 zoósporos/ mL, tornando infecto 95% dos embriões inoculados, acometendo principalmente vasos sanguíneos. Itraconazol e terbinafina apresentaram-se tóxicos na concentração testada, independentemente dos intervalos de tempo em que as doses foram administradas e por outro lado, azitromicina não se demonstrou toxica em nenhuma dose ou intervalo de administração. A partir deste estudo, propomos um novo modelo experimental de pitiose utilizando ovos embrionados de galinha. Esse modelo poderá auxiliar nos testes de eficácia de novos tratamentos de forma simples e rápida.

Palavras-chave: Pitiose. Ovos embrionados de galinha. *Pythium insidiosum*. Modelo de Infecção. Toxicidade.

ABSTRACT

Pythium insidiosum: DEVELOPMENT OF INFECTION EXPERIMENTAL MODEL IN EMBRYONATED EGGS OF *Gallus gallus domesticus*

AUTHOR: Camila Marina Verdi
ADVISOR: Janio Morais Santurio

The pythiosis is a severe disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum* that affects animals and humans. If not diagnosed and treated quickly, the pythiosis can lead to death of the affected individual. Treatment of pythiosis is difficult, as it does not respond well to drugs commonly used in fungal diseases, due to the absence of ergosterol in the *P. insidiosum* membrane. Currently, research on pythiosis treatment uses the rabbit as a model of experimental infection, since they develop an infection similar to that of equines. Seeking to rationalize the use of animals in scientific experimentation, alternative models and in vitro models are increasingly indispensable options. In this context, the use of embryonated chicken eggs (*Gallus gallus domesticus*), in researches with viruses, bacteria and fungi, has been shown to be easy to handle, low cost and good reproducibility, as well as aid in studies of pathogenesis and discovery of new treatments. In this scenario, this work had the objective of developing a new model of experimental infection in vivo for pythiosis, as well as test new treatments. Initially, tests were done to standardize the day of infection and inoculum concentration. After this process, toxicity tests were performed with azithromycin, itraconazole and terbinafine, which had already shown action against *P. insidiosum* in vitro. The concentrations used for azithromycin were 0.2 μg/egg, 1.6 μg/egg and 12.8 μg/egg, itraconazole 12.8 μg/egg and terbinafine 12.8 μg/egg, being administered 0.025 ml in three time intervals, 8/8 hours, 12/12 hours or 24/24 hours. The results showed that the best day for induction of infection was on the 14th day of embryonic development, using a concentration of 500 zoospores/mL, infecting 95% of embryos inoculated, affecting mainly the blood vessels. Itraconazole and terbinafine were toxic at concentration tested, regardless of the time intervals in which the doses were administered, on the other hand, azithromycin has not been shown to be toxic at any dose or interval of administration. From this study, we propose a new experimental model of pythiosis using embryonated chicken eggs. This model can assist in efficacy trials of new treatments quickly and easily.

Keywords: Pythiosis. Embryonated chicken eggs. *Pythium insidiosum*. Model of infection. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reprodução assexuada de *P. insidiosum*, A, B e C formação de zoosporângio. D, E e F liberação dos zoósporos, forma infectante..... 16

Figura 2 - Estruturas e tecidos extraembrionários de ovo embrionado de galinha..... 23

Figura 3 - Ovo embrionado de galinha observado por meio de ovoscopia, demonstrando o embrião e os vasos sanguíneos..... 28

Manuscrito

Figure 1 - Infection scale in umbilical cords of chicken embryo eggs infected with 500 zoospores/mL demonstrated by score…… 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Definição de quantidade de zoósporos no inóculo e dia da inoculação..... 30

Tabela 2- Grupos de avaliação da toxicidade frente a azitromicina, itraconazol e terbinafina..... 31

Manuscrito

Table 1- Definition of number of zoospores in the inoculum and inoculation day..... 46

Table 2- Histological characteristics of umbilical cords from chicken embryos infected with *Pythium insidiosum* with 500 zoospores/mL..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RNA	Ácido Ribonucléico
ID	Imuno Difusão em Ágar
IF	Fixação do Complemento
TI	Teste de Hipersensibilidade Intradérmica
ELISA	Ensaio De Imunoabsorção Enzimática
AMB	Anfotericina B
MC	Menbrana Corioalantoide
CA	Cavidade Alantoide
IgG	Imunoglobulina G
CMA	Corn Meal Agar
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
PVA	Acetato de Polivinila
IHC	Imunohistoquimica
HE	Hematoxilina Eosina
CIM	Concentração Inibitória Mínima

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**.....	13
2	**REVISÃO BIBLIOGRÀFICA**.....	15
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO.....	15
2.2	PITIOSE.....	16
2.2.1	**Pitiose em animais**.....	17
2.2.2	**Pitiose em humanos**.....	18
2.3	DIAGNÓSTICO.....	19
2.4	TRATAMENTO.....	20
2.5	MODELOS DE INFECÇÃO.....	21
2.5.1	**Modelos de infecção da Pitiose..**.....	21
2.5.2	**Modelo experimental com ovos embrionados.....**.....	22
2.5.2.1	*Modelo de infecção experimental com ovos embrionados com bactéria*.....	23
2.5.2.2	*Modelo de infecção experimental com ovos embrionados com fungos*.....	24
2.5.2.3	*Modelo de infecção experimental com ovos embrionados com parasitas*.....	24
2.5.2.4	*Modelo de infecção experimental com ovos embrionados com vírus*.....	24
3	**OBJETIVO**.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
4	**METODOLOGIA**.....	27
4.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	27
4.1.1	**Local do Experimento**.....	27
4.1.2	**Incubação e observação dos ovos para infecção**.....	27
4.1.3	**Preparação do Inoculo**.....	28
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.2.1	**Infecção da Cavidade Alantoide (CA) e testes de toxicidade**.....	29
4.2.2	**Desenvolvimento do modelo experimental**.....	29
4.2.3	**Avaliação da toxicidade dos fármacos**.....	30
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS.....	31
4.3.1	**Isolamento do micro-organismo em agar**.....	32
4.3.2	**Histologia**.....	32
4.3.3	**Reação em cadeia da polimerase (PCR)**.....	33
5	**RESULTADOS**.....	34
5.1	MANUSCRITO 1: EXPERIMENTAL MODEL FOR PYTHIOSIS INSIDIOSI IN EMBRYONATED CHICKEN EGGS……..	34
5.2	TOXICIDADE DOS FARMACOS AZITROMICINA, ITRACONAZOL E TERBINAFINA.....	49
6	**DISCUSSÃO**.....	50
7	**CONCLUSÃO**.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação está dividida em introdução, revisão bibliográfica, metodologia, resultados, discussão e referências.

Os resultados que fazem parte desta dissertação referente ao modelo de infecção estão apresentados sob forma de manuscrito. Os demais resultados estão descritos no item resultado dessa dissertação.

As referências utilizadas no manuscrito estão citadas ao final do mesmo. Já o item referências desta dissertação contém as demais referências utilizadas.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista Infection and Immunity na qual se encontra submetido.

1 INTRODUÇÃO

Pitiose uma doença crônica, que acomete principalmente o tecido subcutâneo, causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*, cuja principal característica clinica é a formação de grânulos. Essa doença atinge várias espécies de animais domésticos, dentre elas equinos, cães e até mesmo o homem (GAASTRA et al., 2010; SANTURIO et al., 2006).

Pythium insidiosum pertence ao reino Stramenopila, classe Oomycetes e família Pythiaceae, é encontrado em ambientes aquáticos que apresentam temperaturas elevadas entre 30 e 40°C, situados em regiões com clima tropical, subtropical e temperado. O *P. insidiosum* já foi relatado nas Américas, alguns países Europeus e sudeste Asiático (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996; MENDOZA et al., 1996). Sua forma infectante são zoósporos provenientes de esporângios durante a fase de reprodução assexuada. Os zoósporos são, na maioria das vezes, atraídos para os pelos dos animais penetrando na epiderme através de um ferimento já existente ou por meio de folículo piloso (SANTURIO et al., 1998). A doença ocorre principalmente em períodos de chuva, acometendo animais que habitam regiões alagadas sem distinguir idade e sexo (MILLER; CAMPBELL, 1982a).

Em humanos a pitiose apresenta altos níveis de morbidade e mortalidade (KRAJAEJUN et al., 2006), acomete principalmente pessoas com talassemia e as principais formas de manifestação da pitiose são: lesões granulomatosas no tecido subcutâneo, disseminada, ocular (principalmente em forma de ceratite) e vascular, podendo desenvolver artrite crônica, trombose arterial e gangrena (IMWIDTHAYA, 1994).

O diagnóstico da pitiose fundamenta-se nos sinais clínicos, histopatológicas e no isolamento do agente. Porém, sua identificação se torna mais dificultosa no início da doença. Atualmente, como auxílio no diagnóstico são utilizadas técnicas sorológicas, histopatológicas e técnicas moleculares que dão suporte a uma identificação prévia e segura (MENDOZA et al., 1996).

O tratamento para pitiose consiste principalmente em excisão cirúrgica, terapia antimicrobiana e uso de imunoterapia. Apesar do tratamento cirúrgico ser considerado um método invasivo, podendo ocorrer até mesmo a amputação do membro, este continua sendo o método mais utilizado nos casos de pitiose. Estudos indicam que a associação de excisão cirúrgica e imunoterápicos apresentam melhores resultados na cura da doença (GAASTRA et al., 2010).

A infecção experimental com *P. insidiosum* em espécies animais naturalmente infectados não se tornou possível, entretanto estudos têm utilizado coelhos como modelo

experimental, para desenvolvimento de lesões semelhantes às que ocorrem em humanos e equinos acometidos pela doença. Além da infecção em coelho, Zanette, et al. (2013a) reproduziram a infecção experimental em moscas *Drosophila melanogaster* deficiente de receptores Tholl-like, o que teve suma importância para entender a imunidade celular contra *P. insidiosum*. A infecção é realizada através de água contendo zoósporos (MILLER; CAMPBELL, 1983).

Novos modelos experimentais de infecção *in vivo* vêm sendo desenvolvidos. O uso de ovos embrionados de galinha são uma ótima opção (JACOBSEN et al., 2012). Ovos embrionados de galinha tem rápido desenvolvimento e uma ótima reprodutibilidade, os quais já foram demonstrados utilizando bactérias, fungos, virus e parasitas (WOLPERT et al., 2000; DEBIASI, 2013).

Neste contexto, buscando racionalizar o uso de animais em experimentação cientifica, torna-se imprescindível a criação de um novo modelo de infecção com *P. insidiosum*, bem como investigação de novos tratamentos para essa doença. Uma alternativa é uso de ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus*, devido a facilidade de manuseio e baixo custo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

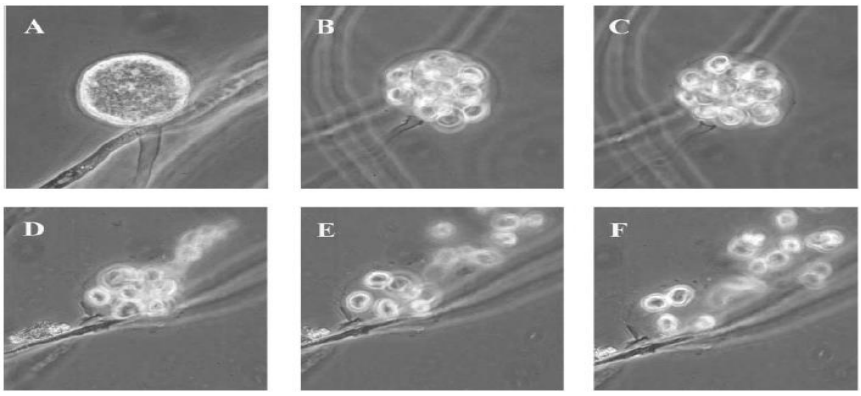
A pitiose tem como agente etiológico *P. insidiosum*, classificado no reino Stramenopila, classe Peronosporomycetes (Oomycetes), ordem Pythiales e família Pythiaceae. Segundo estudos taxonômicos mais detalhados baseados no sequenciamento de RNA ribossomal, os oomicetos estão mais relacionados mais com as algas marrons e com diatomáceas do que com os fungos (ADHIKARI et al., 2013).

O gênero *Pythium* compreende 127 espécies, dentre as quais se encontram alguns dos principais patógenos de plantas (LEVESQUE; DE COCK, 2004), sendo que até pouco tempo atrás, *P. insidiosum* era a única espécie conhecida deste gênero a acometer animais (MENDOZA et al., 2003). Entretanto, em 2011, um patógeno típico de plantas, *P. aphanidermatum*, foi isolado da perna de um soldado ferido no Afeganistão (CALVANO et al., 2011).

Santurio et al. (2006), afirmam que a classe dos oomicetos difere dos fungos por não apresentar quitina, um componente essencial da parede celular fúngica, e além disso não produz ergosterol como principal esteróide, incorporando os esteróides do ambiente ao invés de sintetizá-los. Estes mesmos autores ainda ressaltam que as características dos organismos pertencentes ao filo Oomycota apresentam talo diplóide, parede celular constituída de β-glucanas, celulose e hidroxipolina, reprodução assexuada oogâmica (figura 1), dentre outras.

A oogamia caracteriza-se pela produção de zoósporos biflagelados, o que ocorre em ambientes úmidos. Os zoósporos são a forma infectante do *P. insidiosum*, os quais possuem núcleo, se movimentam através de flagelos, mas não possuem parede celular (GAASTRA et al., 2010).

Figura 1 - Reprodução assexuada de *P. insidiosum*



FONTE: VANITTANAKOM, et al., 2004.

2.2 PITIOSE

No final do século XIX, na Índia, foram descritos por cientistas ingleses, lesões fúngicas em equinos, podendo este ser o primeiro relato de *P. insidiosum*. Essas lesões eram denominadas "Bursattee", termo que significa chuva, uma vez que se acreditava que o aparecimento de granulomas estava relacionado com a época chuvosa (SMITH, 1884).

Designada como uma doença subcutânea vascular, a pitiose pode atingir animais e humanos, sem distinção de raça, gênero ou idade. É caracterizada por apresentar lesões granulomatosas cutânea ou subcutânea, intestinais e, com menor frequência, infecções vasculares disseminadas, as quais têm uma evolução rápida e em alguns casos podem levar à morte (GAASTRA et al., 2010; VIDELA et al., 2012).

O ciclo de vida do *P. insidiosum* fundamenta-se na colonização de plantas aquáticas, as quais servem de substrato para o crescimento e multiplicação do organismo, contribuindo para formação de zoosporângios. Estes liberam zoósporos móveis que vão ao encontro de outra planta, onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a novo micélio e assim completando seu ciclo. Os zoósporos geralmente são atraídos para o pelo do animal, e através de lesões já existentes ou por meio do folículo piloso, penetram na pele gerando a enfermidade (SANTURIO et al., 1998). A adesão dos zoósporos se dá por meio de uma glicoproteína segregada na superfície dos mesmos. Até o momento não há relatos de transmissão direta entre animais ou entre animais e o homem (GAASTRA et al., 2010;

MENDOZA et al., 1996; MENDOZA et al., 1993; MILLER; CAMPBELL, 1982a; SANTURIO et al., 2006; VIDELA et al., 2012).

Os casos de pitiose ocorrem principalmente após uma estação chuvosa, como exemplo, no pantanal brasileiro, a maioria dos casos ocorrem nos meses de fevereiro a maio, período de maior precipitação. Dados epidemiológicos indicam que *P. insidiosum* possui um período de incubação de várias semanas (SANTURIO et al., 2006).

2.2.1 Pitiose em animais

A pitiose se desenvolve em diversas espécies de mamíferos, principalmente em equinos. Lesões cutâneas são as manifestações mais frequentes encontradas nesta espécie animal, afetando extremidades distais dos membros e porção tóraco-abdominal, devido ao maior contato com águas infectadas por zoósporos (CHAFFIN et al., 1992; FOIL, 1996; MENDOZA; ALFARO, 1986; MILLER; CAMPBELL, 1982b).

A maioria dos casos de pitiose em equinos apresenta somente uma lesão, na região das patas ou na porção tóraco abdominais, caracterizada por ser ulcerativa granulomatosa, produzir massas teciduais que variam de tamanho, dispor de bordas irregulares e desenvolver massas branco-amaraledas que são designadas “kunkers” por lembrarem a corais. Os “kunkers” podem apresentar tamanho de 2 a 10 milimetros de diâmetro. Em torno da lesão são encontradas microscopicamente áreas eosinofílicas, circundadas por infiltrados de eosinófilos, macrófagos e uma vasta proliferação de tecido fibrovascular (CHAFFIN et al., 1995; LEAL et al., 2001; MEIRELES et al., 1993; MENDOZA et al., 1996; MILLER; CAMPBELL, 1982a). No Brasil os casos de pitiose em equinos têm ocorrido estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e no Rio de Janeiro, principalmente (SALLIS et al., 2003).

Entre caninos e felinos a pitiose manifesta-se de maneira semelhante. Um estudo que buscou relatar casos de pitiose, foram observados 12 casos em animais de companhia, sendo 11 cães e 1 gato. Dentre esses, 8 apresentaram forma gastrintestinal e 4 de forma subcutânea (GALIZA et al., 2014).

Os cães são a segunda espécie mais afetada pela pitiose. As formas gastrintestinal e cutânea são as mais incidentes. A forma gastrintestinal manifesta-se clinicamente com vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia e presença de massas nodulares observáveis por palpação abdominal (BENTINCK-SMITH et al., 1989; DYKSTRA et al., 1999; FISCHER et al., 1994; GROOTERS, 2003; MILLER et al., 1983).

As mesmas manifestações clinicas são observadas em felinos que adquirem a doença, contudo poucos casos são relatados. Os relatos em felinos citam pitiose subcutânea, nasofaringea e gastrintestinal. Nos casos de pitiose gastrintestinais os principais sinais clínicos são vômito e diarreia (BISSONNETTE et al., 1991; GALIZA et al., 2014; RAKICH et al., 2005).

Casos de pitiose em bovinos foram descritos inicialmente nos Estados Unidos (MILLER et al., 1985). Em 1988, foram descritos os primeiros casos de pitiose bovina no Brasil, os relatos ocorreram no pantanal mato-grossense. Em bovinos a pitiose é pouco frequente, as lesões apresentam-se ulcerativas, com edema e espessamento da derme, na maior parte das vezes localizam-se na região inferior dos membros e abdômen, semelhante ao que ocorre em equinos, porém as lesões são de aspecto seco, com pouco prurido e sem a formação de “kunkers” (GABRIEL et al., 2008; LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 1998). Segundo Santurio et al. (1998), a de pitiose em bovinos apresentaram auto cura, devido a uma resposta inflamatória diferente da resposta dos equinos. Segundo Santos et al., (2011), foram relatados 7 casos de pitiose bovina no pantanal mato-grossense, entre os anos 2009 e 2010, dentre as quais nenhuma resultou em morte do animal.

Outra espécie de mamífero acometida pela pitiose são os ovinos, que geralmente apresentam na cavidade nasal, caracterizadas como rinite micótica, que se apresentam granulomatosas destruindo o palato duro e o vestíbulo nasal, resultando em uma fístula. Os ovinos apresentam sinais clínicos semelhantes aos outros animais, além de secreção nasal serossanguinolenta, dificuldade respiratória e aumento do nariz e lábio superior (BERNARDO et al., 2015; DOS SANTOS, 2010, SANTURIO ET AL.2008).

Foram relatados raros casos de pitiose em camelos, com lesões granulomatosas, situadas na face e na vulva do animal, sem presença de prurido (VIDELA et al., 2012; WELLEHAN et al., 2004). Em animais silvestres mantidos em cativeiros houve relatos de casos esporádicos (CAMUS et al., 2004; GROOTERS, 2003), em aves há um único relato (PESAVENTO et al., 2008).

2.2.2 Pitiose em humanos

Os casos de pitiose humana foram relatados em países como Estados Unidos, Austrália, Haiti, Nova Zelândia, Brasil e Tailândia, onde foi relatado o primeiro caso de pitiose em humanos em 1985, apresentando lesões cutâneas em pacientes talassêmicos. Desde então, vários casos em humanos foram relatados. No Brasil até o momento apenas um caso de

pitiose humana foi relatado (BOSCO, 2005; IMWIDTHAYA, 1994; MARQUES et al., 2006; MENDOZA et al., 1996).

A pitiose em humanos é marcada por altas taxas de morbidade e mortalidade (KRAJAEJUN et al., 2006). Essa doença apresenta-se na maior parte dos casos em pessoas com talassemia. As principais formas de manifestação da pitiose em humanos são: lesões granulomatosas no tecido subcutâneo, disseminada, ocular (principalmente em forma de ceratite) e vascular, podendo desenvolver artrite crônica, trombose arterial e gangrena (IMWIDTHAYA, 1994). Um estudo realizado por Krajaejun (2006), relatou 102 casos, 60 apresentava-se de forma vascular, 34 como ceratite, 5 de forma cutânea ou subcutânea e apenas 3 de forma disseminada, demonstrando que a maioria dos casos de pitiose humana é desenvolvida de forma vascular.

O tratamento da pitiose humana ainda não está estabelecido e por esse motivo é utilizada uma ampla diversidade de fármacos. Em muitos casos se torna necessária a amputação do membro afetado acima da área de oclusão arterial (IMWIDTHAYA, 1994; KRAJAEJUN et al., 2006; LAOHAPENSANG et al., 2009).

2.3 DIAGNÓSTICO

Usualmente, o diagnóstico da pitiose fundamenta-se nos aspectos clínicos, histopatólogicos e no isolamento e identificação do agente, por meio das características morfológicas culturais e reprodutivas. Entretanto, essa forma de diagnóstico não proporciona identificação precoce dos casos de pitiose. Para o diagnóstico precoce e correto, atualmente, são utilizados métodos imunohistoquímicos, moleculares e técnicas sorológicas (MENDOZA et al., 1996).

Técnicas sorológicas foram desenvolvidas para o diagnóstico e monitoramento da resposta imunológica em equinos afetados pelo *P. insidiosum*. As técnicas desenvolvidas por esses autores foram imunodifusão em gel agar (ID), fixação do complemento (FC) e teste de hipersensibilidade intradérmica (TI), que serviam como diagnóstico e também para avaliação da resposta imune humoral. Estes testes foram desenvolvidos e testados em cavalos que possuíam a doença e dentre eles o mais eficaz foi ID, o qual foi comprovado em 100% das amostras, demonstrando assim alta sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos anti *P. insidiosum* (MILLER; CAMPBELL, 1982b).

Mendoza et al., (1997), desenvolveram um teste de ELISA em soro para diagnosticar a pitiose em humanos e animais. Para realização deste teste foram utilizados antígenos solúveis

de hifas sonicadas. Amostras positivas e negativas foram testadas e os resultados comparados com o teste de ID, os resultados demonstraram que o teste de ELISA é eficiente para o diagnóstico da pitiose sendo este o mais utilizado atualmente (MENDOZA et al., 1997; ROSA et al., 1999).

2.4 TRATAMENTO DA PITIOSE

Devido às características do agente, por diferirem na composição da parede celular e na produção de zoósporos, o tratamento para pitiose em humanos e animais torna-se difícil. Os fungos possuem quitina em sua parece celular, porém o *P. insidiosum* possui celulose e β-glucanas, fazendo com que os fármacos antifúngicos sejam ineficazes, uma vez que a maioria desses fármacos tem como alvo inativar a síntese do ergosterol (FOIL, 1996; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989).

As diferentes formas de tratamento variam de acordo com o tamanho, idade, tempo de lesão e estado nutricional do animal. O tratamento mais utilizado para pitiose equina é a intervenção cirúrgica, onde é retirada toda a área afetada, porém esse procedimento torna-se dificultoso em algumas estruturas anatômicas, em especial membros e órgãos vitais (MCMULLAN et al., 1977; MILLER, 1981; SANTURIO et al., 2003a).

Estudos de suscetibilidade *in vitro* tem demonstrado sinergismo entre AmB + terbinabina (CAVALHEIRO et al., 2009b), terbinafina + antifúngicos azólicos e terbinafina + caspofungina (CAVALHEIRO et al., 2009a). Estudos demonstram que o tratamento com o inibidor da síntese de β-glucana, caspofungina, reduz a lesão causada por pitiose em modelo experimental, porém foi observado retorno do desenvolvimento da lesão ao final da terapia (PEREIRA et al., 2007).

Além disso, testes com antibacterianos que atuam na inibição da síntese protéica, como macrolídeos, tetraciclinas e glicicíclina, têm demonstrado sucesso em testes *in vitro* (LORETO et al., 2014; MAHL et al., 2012). Também foram encontrados resultados positivos em associações entre fármacos antifúngicos e antibacterianos e compostos fenólicos timol e carvacrol em testes de suscetibilidade *in vitro*. Foi observado sinergismo elevado nas associações de claritromicina + micafungina (73,33%), minociclina + claritromicina ou azitromicina (93,3%), minociclina + tigeciclina (86,67%) e itraconazol + timol ou carvacrol (96,6%) (JESUS et al., 2015a; JESUS et al., 2014) e em testes *in vivo* e em pitiose induzida experimentalmente com a associação de minociclina e azitromicina (4/6 animais) e na monoterapia com azitromicina (5/6 animais) (JESUS et al., 2015b).

Na pitiose canina as terapias antifúngicas não apresentaram resultados satisfatórios e segundo alguns autores para essa classe de infectados a remoção cirúrgica continua sendo a melhor e mais segura alternativa de tratamento (ADER, 1979; ALVES et al., 2001; ENGLISH; FROST, 1984; HNILICA, 1998).

Estudos demonstraram sucesso no tratamento com raio laser vermelho com compostos de alumínio, neodímio e itrio após a remoção cirúrgica da lesão em equinos, entretanto alguns autores afirmam que a ressecção cirúrgica total associada com imunoterapia para *Pythium insidiosum* é o tratamento mais indicado para cura (SEDRISH et al., 1997; HUBERT et al., 2002).

A imunoterapia vem sendo usada há mais de 25 anos para o tratamento da pitiose equina (GAASTRA et al., 2010), e essa abordagem terapêutica obtém sucesso no tratamento da maioria dos casos da doença. O primeiro imunoterápico para a pitiose equina foi produzido a partir do micélio ultrassonicado de *P. insidiosum*, tendo sido efetivo 50% dos animais submetidos a esse tratamento (MILLER, 1981). Desde então outras formulações têm sido testadas com certo sucesso (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA et al., 2003 SANTURIO ET AL., 2003), inclusive em cães (HENSEL et al., 2003; PEREIRA et al., 2013).

No Brasil, atualmente há um imunoterápico para pitiose equina, o qual foi testado primeiramente em coelhos com a doença induzida experimentalmente. Esse imunoterápico é obtido através do micélio inativado, macerado e liofilizado (SANTURIO et al., 2003), denominado PitiumVac®, produzido pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Pantanal).

Em humanos, a imunoterapia foi usada com sucesso pela primeira vez em um caso de pitiose vascular que não respondeu à cirurgia e terapia com drogas antifúngicas (THITITHANYANONT et al., 1998) e vem sendo usada em casos onde não há resposta aos tratamentos tradicionais (SUDJARITRUK; SIRISANTHANA, 2011; WANACHIWANAWIN et al., 2004).

2.5 MODELOS DE INFECÇÃO

2.5.1 Modelos de infeção da pitiose

Segundo Miller e Campbell (1983) a infecção experimental com *P. insidiosum* em espécies animais naturalmente diagnosticados com pitiose não se tornou possível. Entretanto existem dois modelos experimentais para infecções *in vivo* de pitiose, o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) e mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) deficiente de receptores Toll-like (MILLER; CAMPBELL, 1983; ZANETTE et al., 2013).

A infecção em coelhos é realizada através da inoculação de zoósporos móveis por via subcutânea, intraperitoneal e intravenosa. Nessa infecção, o modelo apresenta aparecimento de nódulos com posterior evolução para fibrogranulomas eosinofilicos. Os coelhos com inserção do inóculo via intra-peritonial desenvolvem hepatite e peritonite, apresentando áreas de necrose contendo hifas e reação granulomatosa com presença de neutrófilos e eosinófilos. Essas lesões são características e similares às lesões apresentadas por equinos, sendo que o agente *P. insidiosum* foi isolado nas mesmas (MILLER; CAMPBELL, 1983).

No modelo com mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster)* a infecção é realizada através de injeção intratoráxica, por meio de agulha fina e estéril mergulhada em solução contendo 10^5 zoósporos/mL. Em um estudo utilizando este modelo foi observada que o ferro tem papel fundamental na patogenicidade da doença, visto que um dos grupos que apresentava a infecção recebeu alimentação enriquecida com ferro e apresentou uma maior taxa de mortalidade comparado com o grupo infectado que recebeu a alimentação convencional (ZANETTE et al., 2013a; ZANETTE et al., 2013b).

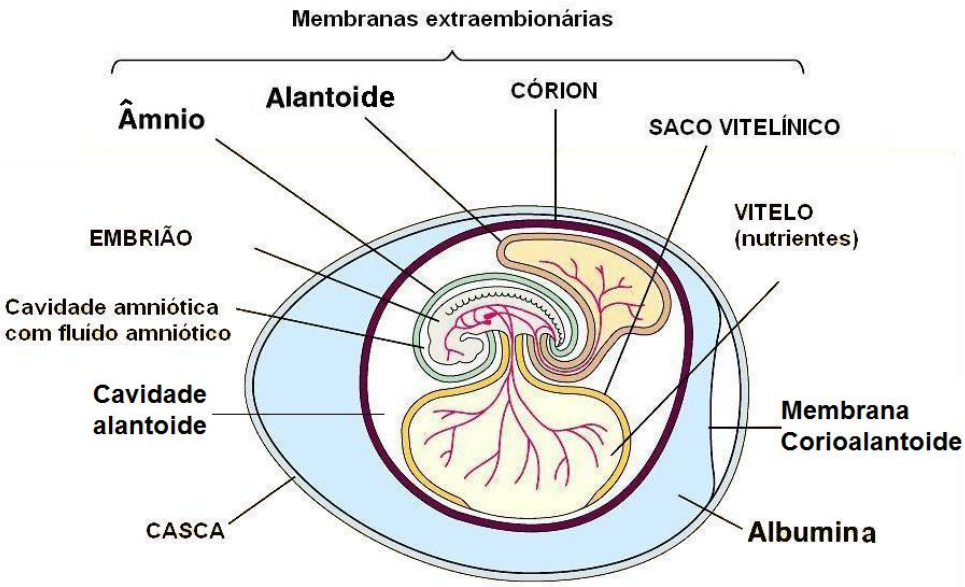
2.5.2 Modelo de infecção experimental com ovos embrionados

Atualmente vêm sendo desenvolvidos novos modelos de infecção *in vivo* que requerem menos equipamentos especializados, sejam de fácil manuseio, e apresentem menores custos que os já disponíveis. Um modelo alternativo que vem sendo utilizado é o uso de ovos embrionados de galinha (JACOBSEN et al., 2012). Os ovos embrionados de galinha apresentam desenvolvimento em apenas 21 dias, e são ricos em vitelo, como forma de nutrição durante o desenvolvimento embrionário (WOLPERT et al., 2000; GILBERT, 2003)

Aproximadamente três dias após a postura do ovo, o embrião possui 40 somitos (estruturas epiteliais), cabeça e coração já formados, também possui vasos sanguíneos conectados com os tecidos extraembrionários (figura 2), possibilitando assim a circulação e batimentos cardíacos. A nutrição do embrião ocorre por meio de membranas extraembrionárias, a proteção mecânica é proveniente do saco amniótico cheio de fluido e a excreção ocorre por meio do alantoide. Antes da eclosão, ocorre o desenvolvimento dos olhos

e ouvidos, há o desenvolvimento dos órgãos internos e o embrião cresce em tamanho. As asas, pernas e bico se formam e ocorrem o surgimento das penas. Após 21 dias de incubação o pinto eclode. (WOLPERT et al., 2000; DEBIASI, 2013)

Figura 2 - Estruturas e tecidos extraembrionários de ovo embrionado de galinha



FONTE: PAIM, A.C., 2016

As células do sistema imune, macrófagos e heterofilos, começam a se desenvolver a partir do 10° dia de incubação do embrião, aumentando a resistência a infecções de acordo com o desenvolvimento embrionário, já os linfócitos desenvolvem-se em etapas, logo após o surgimento do baço (JACOBSEN, et al., 2010).

2.5.2.1 Modelo de infecção experimental com ovos embrionados com bactérias

O modelo experimental com ovos embrionados foi descrito pela primeira vez em 1937, utilizando como forma infectante bactérias, dentre elas de *Staphilococcus aureus*, *Streptococcus haemolyticus*, *Streptococcus viridans*, *Aerobacter aerogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Mycobacterium avium*. Nesse estudo as bactérias foram inoculadas na membrana embrionária, entre o 12° e o 14° dia de desenvolvimento embrionário, e ocorreu a

multiplicação bacteriana dentro do protoplasma das células do embrião, exceto de *S. aureus*, *S. hemolyticus* e *C. diphtheria* (GOODPASTURE; ANDERSON, 1937). A partir deste estudo, foi utilizado o modelo de ovos embrionados de galinha para testes *in vivo* com bactérias e outros micro-organismos.

Em um estudo realizado por Alnassan et al., (2013), ovos embrionados foram infectados com *Clostridium perfringens* juntamente com o protozoário *Eimeria tenella* em grupos isolados e um grupo com os dois micro-organismos, este estudo sugeriu que modelos de infecção em ovos embrionados podem auxiliar na compreensão da patogênese de infecções mistas (ALNASSAN et al., 2013).

2.5.2.2 Modelo de infecção experimental de ovos embrionados com fungos

Estudos realizados com fungos utilizando ovos embrionados obtiveram grande êxito em seus resultados, determinando virulência de fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, infectando o ovo pela membrana coroalantoide (CAM) (JACOBSEN et al., 2012). Esses modelos de infecção dependem da concentração do inóculo para ocasionar a infecção e a morte do embrião. A viabilidade pode ser acompanhada após a inoculação, e com base em análises patológicas, a invasão de membranas embrionárias e vasos sanguíneos leva à morte do embrião. Os estudos realizados com fungos demonstraram que o modelo de infecção com ovos embrionados auxilia na determinação da virulência desses microrganismos (JACOBSEN et al., 2010).

2.5.2.3 Modelo de infecção experimental de ovos embrionados com parasitas

Foram relatados também modelos de infecção utilizando ovos embrionados com parasitas como *Neospora caninum* que é conhecido por causar abortos em bovinos. Esse modelo teve como o objetivo a avaliação da carga parasitária, produção de anticorpos IgG e avaliação das lesões causadas pelo parasita nos embriões, a inoculação do parasita foi realizada na cavidade alantoide de ovos embrionados. Os embriões expostos ao parasita demonstraram suscetibilidade à infecção e taxa de mortalidade em torno de 50% independentemente da dose do inóculo (FURUTA et al., 2007).

2.5.2.4 Modelo de infecção experimental de ovos embrionados com vírus

Em vírus, o modelo experimental de ovos embrionados fornece o cultivo e a observação da replicação viral ao longo do desenvolvimento embrionário (XIA et al., 2013). Em um estudo utilizando ovos embrionados para observação da mutação e armazenamento do vírus influenza, a inoculação ocorreu na cavidade alantoide, onde, com o auxílio de uma agulha, é incubada uma solução estoque do vírus. Posteriormente, os ovos foram abertos e o fluido alantóico foi removido e centrifugado para posteriores estudos com o vírus (BRAUER; CHEN, 2015).

Esse modelo também é utilizado para avaliar a virulência e patogenicidade dos vírus, além de estudar os receptores específicos para desenvolvimentos de tratamentos para viroses (MOCHALOVA et al., 2003; TUMPEY et al., 2005; XIA et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um modelo experimental de pitiose em ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir os melhores parâmetros (concentração de zoósporos, dia de infecção e tempo até a morte) de *Pythium insidiosum* capazes de provocar infecção em ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus*;

- Avaliar a toxicidade dos fármacos já utilizados em testes *in vitro*, azitromicina, terbinafina e itraconazol, em ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus;*

4 METODOLOGIA

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 188 ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*), provenientes do laboratório de avicultura da Universidade Federal de Santa Maria. Os ovos foram mantidos em incubadora giratória especializada (Premium Ecologica IP 70 A) sob temperatura de 37,6 °C, controle de umidade relativa de 50% a 60% e viragem a cada 6 horas. Na incubadora foram alojados 60 ovos por incubação, sendo que cada incubação teve duração de 21 dias. Foi realizada visualização diária do desenvolvimento embrionário e os ovos que não apresentaram embrião foram descartados. Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, sob o protocolo de número CEUA6982100616.

4.1.1 Local do experimento

As avaliações *in vivo* foram desenvolvidas nas dependências do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), prédio 20, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.1.2 Incubação e observação dos ovos para infecção

A infecção com *Pythium insidiosum* em ovos embrionados foi realizada conforme descrito por Jacobsen et al. (2012), adaptada para a espécie *P. insidiosum*. Foram utilizados ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus*, com no máximo 7 dias pós postura antes da incubação. Após obtenção, os ovos passaram por processo de assepsia com álcool 70% e foram depositados na incubadora. Todos os ovos foram mantidos com o pólo pontiagudo na mesma direção, para manter uma homogeneidade na viragem. A viabilidade dos embriões foi observada diariamente, a partir do quarto dia de incubação com auxílio de um ovoscópio.

A ovoscopia foi realizada em uma sala escura utilizando um forte foco de luz, dessa forma as estruturas internas e os movimentos do embrião eram visualizados. Na observação dos ovos, o padrão dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóide (MC) são claramente visualizados (figura 3). O embrião aparece de forma escura no interior do ovo (aumentando de

tamanho conforme a idade). O movimento embrionário é provocado pelo calor da fonte de luz. Após a observação os ovos que não apresentavam movimentos embrionários foram descartados.

Antes da inoculação todos os ovos foram observados para a verificação do desenvolvimento embrionário e a sua sobrevivência. O espaço natural de ar e os vasos sanguíneos eram marcados, para que a inoculação não causasse hemorragia e morte do embrião.

Figura 3 - Ovo embrionado de galinha observado por meio de ovoscopia demonstrando o embrião e os vasos sanguíneos

FONTE: ROCHA, V., 2014.

4.1.3 Preparo do inóculo

Para a preparação do inoculo foi utilizada a cepa padrão CBS 101555, proveniente de um caso de pitiose equina, identificada como DMVP 118/98. Para a indução da zoosporogênese, o isolado foi cultivado em meio Corn Meal Agar ou Extrato de Levedura 0,4% (pH 6.0 ± 0.2, Himedia®), em estufa à 37°C por 24-48 horas. Após foram colocados pequenos fragmentos de grama (Paspalum notatum) sobre o *P. insidiosum*, que será incubado à 37ºC por 24 horas. Passado esse período, os fragmentos de grama colonizados serão transferidos para uma nova placa contendo 15 mL de meio de indução de zoosporogênese composto por água e sais e incubados à 37º C por 8-24 horas. Os fragmentos de grama foram

retirados e a concentração de zoósporos determinada e ajustada por meio de contagem em câmara de Neubauer (MENDOZA & PRENDAS, 1988).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Infecção da cavidade alantoide (CA) e testes de toxicidade

A inoculação de zoósporos, foi realizada em sala climatizada, previamente foi realizada assepsia dos ovos álcool 70º. Com o auxílio da ovoscopia, foi observado o local de inoculação, para que o embrião não fosse atingido. Com agulha estéril os ovos foram perfurados, fazendo um pequeno orifício na casca. Esse procedimento foi repetido para todos os ovos do estudo.

Posteriormente foi inoculado 0,1 mL do inóculo da solução contendo zoósporos na cavidade alantoide. A agulha foi inserida somente a poucos milímetros do orifício para evitar que atingisse os vasos sanguíneos. O fechamento do orifício foi realizado com uma pequena quantidade de cola atóxica composta de acetato de polivinila (PVA). Após a inoculação, os ovos foram incubados novamente para realização da monitorização de sobrevivência do embrião duas vezes ao dia.

Para realização dos testes de toxicidade utilizou-se a mesma metodologia descrita acima, porém inoculando 0,025 mL das concentrações testadas dos fármacos azitromicina (0,2 µg/ovo, 1,6 µg/ovo e 12,8 µg/ovo), itraconazol (12,8 µg/ovo) e terbinafina (12,8 µg/ovo) em intervalos de tempo de 8/8 horas, 12/12 horas ou 24/24 horas por 3 dias.

Após o término do experimento, os embriões sobreviventes foram eutanasiados, as amostras foram coletadas e posteriormente os embriões foram autoclavados antes de serem descartados.

4.2.2 Desenvolvimento do modelo experimental

Para o desenvolvimento do modelo experimental, foram realizados diversos testes com a finalidade de definir o dia da inoculação e a dose de zoósporos infectantes capazes de desenvolver a doença. Foram formados 15 grupos (n=5). As inoculações ocorreram nos dias 10, 12 e 14 de incubação. As concentrações testadas foram de 100, 500, 2000 e 11250 zoósporos/mL, sendo inoculado 0,1 mL, como demonstrado na tabela 1. Como controle negativo foi utilizado PBS.

Tabela 1 - Definição de quantidade de zoósporos no inóculo e dia da inoculação.

Grupo n° (n = 5)	Quantidade de zoósporos por ovo	Dia da inoculação	Tempo até a morte
1	10	10° dia	48 horas
2	50	10° dia	24 horas
3	200	10° dia	24 horas
4	1125	10° dia	24 horas
5	PBS	10° dia	Não houve morte
6	10	12° dia	48 horas
7	50	12° dia	48 horas
8	200	12° dia	24 horas
9	1125	12° dia	24 horas
10	PBS	12° dia	Não houve morte
11	10	14° dia	Não houve morte
12	50	14° dia	72 horas
13	200	14° dia	48 horas
14	1125	14° dia	24 horas
15	PBS	14° dia	Não houve morte

PBS (tampão fosfato salino): Controle negativo

Após avaliação dos resultados e estando definido o melhor dia para inoculação infecção e a melhor quantidade de zoósporos, foi realizado o teste para confirmação do modelo de infecção experimental utilizando 23 ovos embrionados, sendo 20 inoculados com zoósporos e três ovos inoculados com 0,1 mL de PBS utilizados como controle negativo.

4.2.3 Avaliação da toxicidade dos fármacos

Para testes de toxicidade foram utilizados os fármacos azitromicina, itraconazol e terbinafina. Itraconazol e terbinafina foram testados para posteriores testes de associações. Esses fármacos apresentaram atividade *in vitro* contra o *P. insidiosum* (LORETO et al., 2014). As concentrações foram baseadas a partir de dados já relatados em testes de suscetibilidade *in vitro* (JESUS et al., 2015b), utilizando para itraconazol e terbinafina doses de 512 µg/mL (12,8 µg/ovo por inoculação). Para os testes com azitromicina as concentrações testadas foram de 8 µg/mL (0,2 µg/ovo), 64 µg/mL (1,6 µg/ovo) e 512 µg/mL (12,8 µg/ovo). Os testes de toxicidade ocorreram em um período de três dias em intervalos de tempo de 8, 12 e 24 horas, e foram inoculados 0,025 mL das concentrações por vez.

Os grupos experimentais para verificação da toxicidade do fármaco nos embriões estão demonstrados na tabela 2. Os grupos eram compostos de um numero de 5 embriões, a inoculação foi realizada no 14° dia.

Tabela 2. Grupos de avaliação da toxicidade frente a azitromicina, itraconazol e terbinafina.

Grupo n° (n=5)	Intervalo de tratamento	Fármaco	Solução estoque	Concentração do fármaco por ovo
1	8/8 horas	Azitromicina	8 µg/mL	0,2 µg/ovo
2	12/12 horas	Azitromicina	8 µg/mL	0,2 µg/ovo
3	24/24 horas	Azitromicina	8 µg/mL	0,2 µg/ovo
4	8/8 horas	Azitromicina	64 µg/mL	1,6 µg/ovo
5	12/12 horas	Azitromicina	64 µg/mL	1,6 µg/ovo
6	24/24 horas	Azitromicina	64µg/mL	1,6 µg/ovo
7	8/8 horas	Azitromicina	512µg/mL	12,8 µg/ovo
8	12/12 horas	Azitromicina	512µg/mL	12,8 µg/ovo
9	24/24 horas	Azitromicina	512µg/mL	12,8 µg/ovo
10	8/8 horas	Itraconazol	512µg/mL	12,8 µg/ovo
11	12/12 horas	Itraconazol	512µg/mL	12,8 µg/ovo
12	24/24 horas	Itraconazol	512µg/mL	12,8 µg/ovo
13	8/8 horas	Terbinafina	512µg/mL	12,8 µg/ovo
14	12/12 horas	Terbinafina	512µg/mL	12,8 µg/ovo
15	24/24 horas	Terbinafina	512µg/mL	12,8 µg/ovo
16	8/8 horas	PBS	---	---
17	12/12 horas	PBS	---	---
18	24/24 horas	PBS	---	---

PBS (tampão fosfato salino): Controle negativo

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

O processamento das amostras de ovos infectados (CA ou partes do embrião) foi realizado de modo semelhante aos tecidos de outros animais. Os embriões vivos foram selecionados a partir da iluminação por ovoscopia. Para assepsia utilizou-se álcool 70° em toda superfície e posteriormente o ovo era aberto com o auxílio de uma tesoura estéril, cortando a parte superior da casca, partindo do orifício da extremidade pontiaguda do ovo. Foram cortadas e removidas a casca e a CAM.

Após a abertura do ovo, os embriões vivos foram eutanasiados. O método de eutanásia de embriões é realizado por meio de congelamento, porém o agente infectante estudado não sobrevive a baixas temperaturas, neste caso, o embrião passava por procedimento de decapitação.

4.3.1 Isolamento do micro-organismo em agar

Para realização do isolamento do *P. insidiosum*, os ovos foram abertos e uma pequena parte do saco vitelínico contendo vasos sanguíneos foi retirada e depositada sobre placas de Petri contendo ágar extrato de levedura. Após o procedimento, as amostras foram incubadas por 5 dias a uma temperatura de 37°C, uma pequena porção do crescimento foi utilizada para crescimento em caldo e posterior realização da PCR. Após o isolamento do micro-organismo, foi realizado o procedimento de produção de zoósporos para confirmação da infecção pelo *P. insidiosum*.

4.3.2 Histologia

Para análise histopatológica foram removidos o fígado, o coração, os pulmões e os rins, além do cordão umbilical. As amostras foram fixadas em formol neutro a 10% e foram processadas rotineiramente para histopatologia. A partir dos blocos de parafina foram confeccionadas lâminas histológicas contendo seções de 3 μm coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (microscopia de luz) com magnificações de 50x, 100x e 400x.

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada adaptada da técnica previamente descrita por Gabriel et al (2008). Resumidamente, foram utilizadas lâminas silanizadas com seções histológicas de 3 μm. Após a desparafinização e reidratação dos tecidos, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através do uso de peróxido de hidrogênio a 3% (Kit Easy Link One; EasyPath), seguido da recuperação antigênica com solução de TRIS-EDTA (pH 9,0) em forno micro-ondas (potência máxima) por 10 minutos. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com solução bloqueadora de proteína por 10 minutos seguida de lavagem rápida com água destilada (Kit Easy Link One; EasyPath).

Como anticorpo primário foi utilizado um anticorpo policlonal anti-*Pythium insidiosum* produzido em coelho (não comercial), diluído a 1:1.000 em tampão fosfato salino com tween 20 (PBST) e incubado por 60 minutos a 37°C. Como anticorpo secundário e sistema de detecção foi utilizado o polímero Easy Link One (Kit Easy Link One; EasyPath) incubado à temperatura ambiente por 20 minutos, e marcado através da adição do cromógeno DAB (tetracloreto de 3-3’diaminobenzidina; Kit Easy Link One; EasyPath). As seções foram contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com resina sintética

(Entellan, Merck) e lamínulas. Como controle positivo foram utilizadas seções histológicas de casos positivos de pitiose equina.

Como controles negativos foram utilizadas as mesmas seções testadas, com a substituição do anticorpo primário por diluente de anticorpo (PBST). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (microscopia de luz) com magnificações de 50x, 100x e 400x.

4.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todos os isolados recuperados a partir dos ovos forma enviados para identificação molecular. Uma pequena porção do micélio de cada isolado foi repicado em caldo Sabouraud, mantidos durante 5 dias, a uma temperatura de 37° C e 120 rotações por minuto (RPM), as hifas de *P. insidiosum* foram coletadas por meio de filtração e congeladas em nitrogênio líquido até o momento da extração. A extração do DNA e a PCR-Nested foram realizadas de acordo com o protocolo de Botton et. al. (2011).

5 RESULTADOS

5.1 MANUSCRITO 1

Experimental Model For Pythiosis Insidiosi In Embrionated Chicken Eggs

Camila M. Verdi[1], Francieli P. K. Jesus[1], Glaucia Kommers[2], Pauline C. Ledur[1], Maria I. Azevedo[1], Erico S. Loreto[1], Juliana S. M. Tondolo[1], Eduardo N. C. Andrade[3], Karine B. Schlemmer[1], Sydney H. Alves[4], Janio M. Santurio[1*]

Manuscrito submetido à revista Infection and Immunity.

EXPERIMENTAL MODEL FOR PYTHIOSIS INSIDIOSI IN EMBRYONATED CHICKEN EGGS

Camila M. Verdi[a], Francieli P. K. Jesus[b], Glaucia Kommers[c], Pauline C. Ledur[a], Maria I. Azevedo[a], Erico S. Loreto[d], Juliana S. M. Tondolo[a], Eduardo N. C. Andrade[e], Karine B. Schlemmer[a], Sydney H. Alves[d], Janio M. Santurio[a*]

[1] Laboratório de Pesquisas Micológicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria;

[2] Laboratório de Química Orgânica, Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

[3] Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria;

[4] Laboratório de Pesquisas Micológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria;

[5] Graduando em Medicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria;

Running Title: *Pythium insidiosum*: a New Infection Model

* Corresponding author: Prof. Dr. Janio M Santurio (janio.santurio@gmail.com), Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Phone/Fax: + 55 55 3220 8906

ABSTRACT:

Pythiosis is a severe disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum* that can affect animals and humans. The infection is presented in granulomatous form, is gastrointestinal, and in humans mainly affects vasculature or causes keratitis. Currently, the research on the treatment of pythiosis uses rabbits for experimental infection models, as they develop a similar infection to those of horses. To rationalize the use of animals in scientific experimentation, alternative models and *in vitro* models are increasingly necessary options. In this context, the use of embryonated chicken eggs in research with viruses, bacteria and fungi, has been shown to be easy to handle, low cost and provide good reproducibility. The objective of this study was to establish a new experimental infection model for pythiosis using embryonated chicken eggs. The standard strain of *Pythium insidiosum* CBS 101555 zoospores were used at a concentration of 500 zoospores/mL for inoculation. All embryos (n = 20) were dead within 72 hours after inoculation; the first death was observed after 48 hours. The infection was confirmed by culture, PCR and histopathology. Tissue (umbilical cord) and organs (liver, kidneys, lungs and heart) were analyzed by histological techniques, confirmed the presence of hyphae in the walls and lumen of blood vessels in the umbilical cords in 95% (n = 19) of embryos and only one liver (5%). Based on our results, we can conclude that there was experimental infection in embryonated chicken eggs, thus demonstrating an experimental model similar to vascular pythiosis.

Keywords: Pythiosis; Embryonated chicken eggs; *Pythium insidiosum*; Zoospores; Experimental model.

INTRODUCTION

Pythiosis, a severe disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum* (1), is acquired by the penetration of mobile biflagellated zoospores mainly through injuries (2). In horses, cattle and dogs, most cases present as a granulomatous skin disease or gastrointestinal disease. In humans, mainly thalassemic patients, three forms of disease manifestation are observed: granulomatous lesions, a systemic form causing arteritis and keratitis (3, 4).

Animal species susceptible to pythiosis are resistant to experimental infection by *P. insidiosum* (5). To date, this disease has been experimentally reproduced in rabbits *(Oryctolagus cuniculus)* and in fruit flies *(Drosophila melanogaster)* deficient in Toll-like receptors (6-8). For the experimental infection, inoculation of zoospores is used, which triggers the development of the disease (9).

An *in vivo* infection model is proposed that uses embryonated eggs. This model has been used in past decades as an experimental model with viruses and bacteria and has the advantages of low cost and ease of handling (10). The embryonated egg model proved to be effective for infection by *Aspergillus fumigatus*, which helped to evaluate the virulence and pathogenicity of the same (11). In this context, the objective of this study was to establish a new experimental infection model for pythiosis using embryonated chicken eggs.

MATERIALS AND METHODS

Pythium insidiosum

The strain of *P. insidiosum* used to prepare the inoculum came from a case of equine pythiosis. This strain of *P. insidiosum* is identified as DMVP 118/98 (CBS 101555).

Inoculum

To prepare the inoculum, the strain of *P. insidiosum* was cultivated in yeast extract Agar for 5 days at 37 °C. The production of zoospores was performed according Santurio, et al., 2003. For experimental infection, a concentration of 500 zoospores/ml counted in a Neubauer's Chamber was used.

Experimental Model

Were used a number of 75 embryonated eggs for standardization of inoculum concentration and best day of infection (table 1). After defining the best parameters of infection, twenty-three embryonated eggs of *Gallus domesticus* were used for a confirmation of the experimental model using as positive control 20 eggs inoculated with the concentration of 50 zoospores / egg. This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria (UFSM) under protocol number CEUA6982100616.

Preparation of eggs and infection in the allantoic cavity

The preparation of the eggs occurred following the methodology described by Jacobsen (2012) adapted for *P. insidiosum*. To be used in the experiments, the eggs should have a maximum of 7 days post oviposit before incubation. During the incubation period, the eggs were kept in a specialized incubator (Premium Ecologica IP 70 A) at a temperature of 37.6 °C, relative humidity control of 50% to 60% and turning every 6 hours. The presence of an embryo was observed through a strong focus light from the 4th day of incubation until the day of infection (candling). Before the inoculation procedure, the entire egg surface was cleaned with 70% alcohol, the shell was perforated using a sterile needle size 40x12 μm fixed in a rubber stopper n° 18; to seal the hole, a non-toxic glue composed of Polyvinyl Acetate (PVA) was used. To standardize the test, previous analyses were performed for the zoospore concentration adjustment and determination of the day of inoculation.

Infection in the allantoic Cavity

The zoospore inoculation was performed at day 14 of incubation. For this purpose, 0.1 mL of the inoculum was applied to the allantoic cavity, in the yolk sac between vascularization using a sterile insulin needle and syringe. The tests were done to define the best concentration of zoospores. The concentrations tested were 10, 50, 200 and 1125 zoospores per egg on three different days (table 1) counted in a Neubauer chamber. During the viability evaluation, embryonic movements were observed; after no more movement was observed, the egg was opened and the embryo was removed to collect of the organs (liver, kidneys, lungs and heart) and the umbilical cord. After setting the optimal concentration, the tests were repeated using 20 embryonated eggs as positive control inoculated with 0.1 mL of inoculum at the concentration of 50 zoospores/egg and 3 eggs from the negative control group

treated with 0.1 mL of PBS. The data was demonstrated in scores, with a score of 0 without visible hyphae, or +, ++ and +++ proportional to the increase in the fungal load of the tissue.

Sample Collection

After the vitality of the embryo was no longer observed, the embryos were removed from the incubator, and organs and tissues were removed aseptically in a flow chamber.

Microorganism Isolation

For isolation of *P. insidiosum*, the eggs were opened, and a small part of the yolk sac was removed and deposited on Petri plates containing 0.4% of yeast extract Agar medium and incubated for 5 days at 37 °C.

Histopathology And Immunohistochemistry

Samples of kidneys, liver, lungs, heart and umbilical cord were removed aseptically and kept in 10% neutral formaldehyde; then, samples were routinely processed for histopathology. From paraffin blocks, histological slides were prepared containing sections of 3 μm stained by the hematoxylin and eosin technique (HE).

The immunohistochemistry technique (IHC) was performed as adapted from the technique previously described by Gabriel et al., (2008) (12).

Polymerase Chain Reaction

All the isolates recovered from the embryos were subjected to molecular identification through the PCR-Nested technique according to the protocol of Botton et al. (2011) (13).

RESULTS

On the 10th and 12th day of embryonic development the concentrations of 10 and 50 zoospores/egg tested caused the death of the embryos within 48 hours, already the concentrations of 200 and 1125 zoospores/egg in up to 24 hours being that in these groups the first death occurred with 12 hours of infection. In infections carried out on the 14th day of embryonic development the concentration of 10 zoospores/egg didn't cause death or embryo infections until day 21. However, at concentrations of 50 zoospores / egg embryos died within 72 hours, 200 zoospores / egg within 48 hours and 1125 days within 24 hours.

The concentration selected for the infection of the embryos was 50 zoospores/egg on the 14th day of embryonic development, which caused the death of the embryo within 72 hours after inoculation and that could enable further testing of pythiosis treatments.

After inoculation with zoospores, in the positive group containing 50 zoospores/egg of *P. insidiosum*, 19 of the 20 embryos died within 72 hours, of which 6 died 48 hours after inoculation. Only one embryo died on day 21 of incubation. Nineteen embryos presented hyphae in the umbilical cord (figure 1), but this quantity had a variation that can be observed in table 2. In the isolation of *P. insidiosum* after inoculation, there was growth in agar in 18 of the 20 embryos, which was confirmed by the PCR technique. In histopathological analyses, hyphae were observed in 15 umbilical cords, already in the immunohistochemistry the infection was observed in 19 umbilical cords (table 2). However, only one embryo had hyphae in the liver; hyphae were not observed in other organs in any embryo. The negative control group showed no change.

DISCUSSION

In humans, pythiosis develops in most cases in thalassemic patients; it is believed that high levels of iron may be related to a modulation in the pathogenesis of the disease (1, 8, 14). According to Wanachiwanawin (2000), pathological human changes evolve along the arterial wall and form thrombi that affect the circulation and engaging members, which in most cases result in amputation; they may also affect the liver and kidneys, resulting in a fatal disseminated disease (15). In our study with embryonated chicken eggs, we were able to reproduce an experimental infection with *P. insidiosum* and confirm the infection by isolation, PCR and histopathological analysis. A total of 95% (n = 19) of embryos infected with 500 zoospores/mL had hyphae and thrombi in the blood vessels, and 5% (n = 1) had hyphae in the liver, suggesting disseminated infection.

The experimental model of pythosis used for *in vivo* tests to date is the rabbit, and they demonstrate granulomatous lesions similar to observed in equine pythiosis (9). There is no experimental model in the literature that presents vascular lesions as described in human pythiosis; in this way, the embryonated egg can be used as an experimental model *in vivo*, which will aid in the discovery of more effective treatments for pythiosis vascular infections.

Embryonated eggs have already been used as an experimental model in fungal infections described by Jacobsen et al. (2010), that were easy to handle and helped in the discovery of new treatments. In this experimental model using embryonated eggs infected with *P. insidiosum,* characteristic histopathological signs similar to of human pythiosis were observed, affecting blood vessels with hyphae and thrombi, thus preventing the exchange of oxygen and nutrients to the yolk sac and causing the death of the embryo. The concentration

of 50 zoospores/egg was able to infect the embryo without causing acute death, but at lower concentrations it was not able to infect the embryo.

From this study, we propose a new experimental model of pythiosis using embryonated eggs, thus being able to test the efficacy of new treatments in a simple and fast way. Based on our results, we can conclude that there was experimental infection in embryonated chicken eggs, mainly affecting blood vessels (95%), thus demonstrating an experimental model similar to vascular pythiosis.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. We thank the Brazilian agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their support. FPKJ is the recipient of a PDJ-CNPq fellowship.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Pracharktam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W,

Wongsaisuwan M, Somkaew S. 2006. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis 43:569-576.

2. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. 1993. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. J Clin Microbiol 31:2967-2973.
3. Leal ABM, Leal AT, Santurio JM, Kommers GD, Catto JB. 2001. Pitiose equina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. Pesquisa Veterinária Brasileira 21:151-156.
4. De Cock AW, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. J Clin Microbiol 25:344-9.
5. Mendoza L, Ajello L, Mcginnis MR. 1996. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. J Mycol Med 6:151-164.
6. Santurio JM, Leal AT, Leal AB, Festugatto R, Lubeck I, Sallis ES, Copetti MV, Alves SH, Ferreiro L. 2003. Three types of immunotherapics against pythiosis insidiosi developed and evaluated. Vaccine 21:2535-2540.
7. Mendoza L, Newton JC. 2005. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. Med Mycol 43:477-486.
8. Zanette RA, Santurio JM, Loreto ES, Alves SH, Kontoyiannis DP. 2013. Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. Microbiol Immunol 57:732-5.
9. Miller RI, Campbell RS. 1983. Experimental pythiosis in rabbits. Sabouraudia 21:331-41.
10. Jacobsen ID, Grosse K, Hube B. 2012. Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. Methods Mol Biol 845:487-96.

11. Jacobsen ID, Grosse K, Slesiona S, Hube B, Berndt A, Brock M. 2010. Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. Infect Immun 78:2995-3006.

12. Gabriel AL, Kommers GD, Trost ME, Barros CSL, Pereira DB, Schwendler SE, Santurio JM. 2008. Surto de pitiose cutânea em bovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira 28:583-587.

13. Botton SA, Pereira DI, Costa MM, Azevedo MI, Argenta JS, Jesus FP, Alves SH, Santurio JM. 2011. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. Curr Microbiol 62:1225-1229.

14. Zanette RA, Alves SH, Pilotto MB, Weiblen C, Fighera RA, Wolkmer P, Flores MM, Santurio JM. 2013. Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model. J Antimicrob Chemother 68:1144-7.

15. Wanachiwanawin W. 2000. Infections in E-beta thalassemia. J Pediatr Hematol Oncol 22:581-7.

Table 1. Definition of number of zoospores in the inoculum and inoculation day

Group n ° (n = 5)	Quantity of zoospores per egg	Inoculation day	Time Kill
1	10	10	48 hours
2	50	10	24 hours
3	200	10	24 hours
4	1125	10	24 hours
5	PBS	10	No death
6	10	12	48 hours
7	50	12	48 hours
8	200	12	24 hours
9	1125	12	24 hours
10	PBS	12	No death
11	10	14	No death
12	50	14	72 hours
13	200	14	48 hours
14	1125	14	24 hours
15	PBS	14	No death

PBS (phosphate buffered saline): Control negative

Table 2. Histological characteristics of umbilical cords from chicken embryos infected with *Pythium insidiosum* with 500 zoospores/mL.

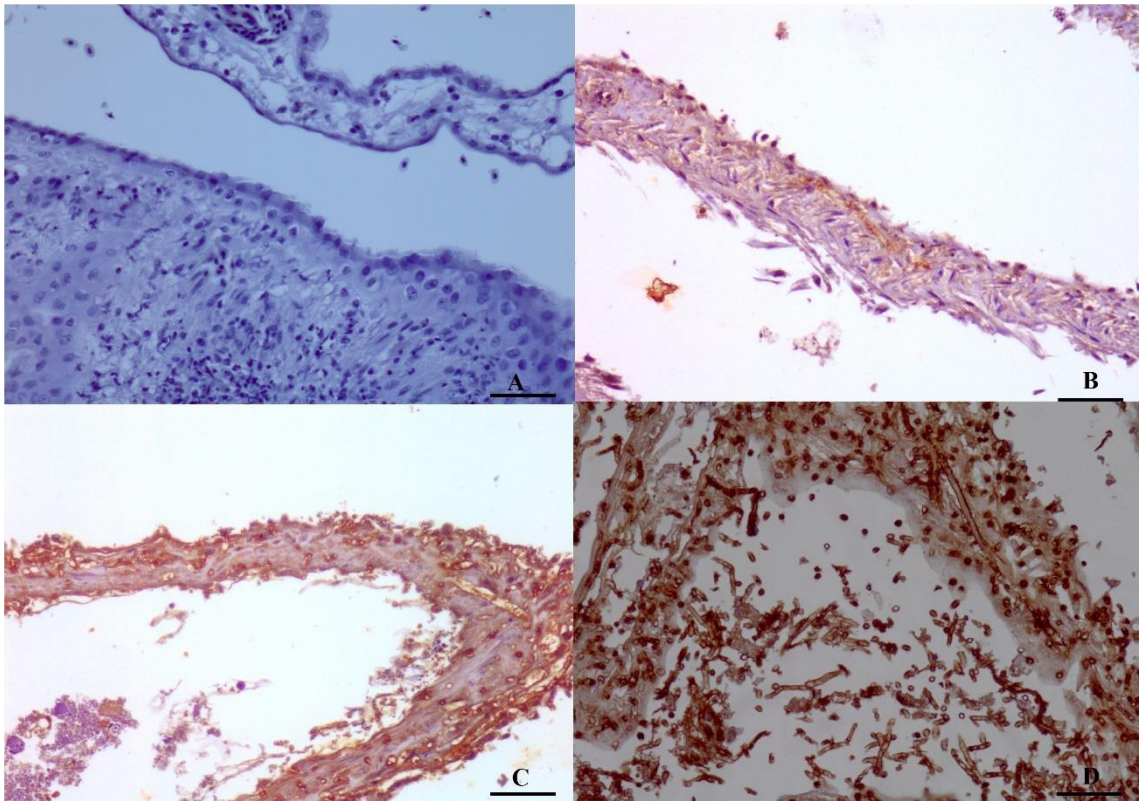
Embryo n °	Histopathology	Immunohistochemistry	Time Kill
01 C-	Unchanged umbilical cord	0	No death
02 C-	Unchanged umbilical cord	0	No death
03 C-	Unchanged umbilical cord	0	No death
01 C+	Unchanged umbilical cord	+	8 hours
02 C+	Basophilic hyphae	+	48 hours
03 C+	Basophilic hyphae	+++	48 hours
04 C+	Numerous negative images of hyphae, few hyphae slightly basophilic on the walls of blood vessels	+++	48 hours
05 C+	Basophilic hyphae on the wall of a blood vessel	+	48 hours
06 C+	Unchanged umbilical cord	+	48 hours
07 C+	Basophilic hyphae on the wall and inside vessels amid a clot	+++	72 hours
08 C+	Unchanged umbilical cord	+	72 hours
09 C+	Numerous negative images of hyphae on the wall and inside blood vessels	+++	72 hours
10 C+	Basophilic hyphae on the wall of a blood vessel	++	72 hours
11 C+	Negative images of hyphae, especially on the wall of blood vessels	+++	72 hours
12 C+	Unchanged umbilical cord	ND	72 hours
13 C+	Negative images of hyphae, especially on the wall of blood vessels	+++	72 hours
14 C+	Negative images of hyphae, especially on the wall of blood vessels	++	72 hours
15 C+	Negative images of hyphae, especially on the wall of blood vessels	++	72 hours
16 C+	Numerous slightly basophilic hyphae and negative images of hyphae, mainly in the wall of blood vessels and in the middle of eosinophilic debris	+++	72 hours
17 C+	Negative images of hyphae, especially on the wall of blood vessels	+++	72 hours
18 C+	Unchanged umbilical cord	+	72 hours
19 C+	Unchanged umbilical cord	+	72 hours
20 C+	Negative images of hyphae, especially on the wall of blood vessels	+	168 hours

C-: negative control inoculated with PBS, C+: Positive control inoculated with zoospores, +: used to indicate tissue fungal load, 0: without change, ND: Not detection

Figure Legends

Figure 1. Infection scale in umbilical cords of chicken embryo eggs infected with 500 zoospores/mL demonstrated by score. Histopathology without changes, negative control (A), histopathology with presence of basophilic hyphae, score + (B), histopathology with presence of basophilic hyphae, score ++ (C), histopathology with presence of basophilic hyphae, score +++ presenting numerous hyphae (D). The slides were examined by light microscopy with magnification of 400x.

Figure 1



5.2 TOXICIDADE DOS FARMACOS, AZITROMICINA, ITRACONAZOL E TERBINAFINA EM EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*

A dose testada para itraconazol se mostrou tóxica em todos os embriões, independentemente dos intervalos de tempo entre as administrações, causando a mortalidade dos mesmos antes da eclosão. Os resultados da terbinafina foram semelhantes, no qual os embriões morreram até o 21° dia, quando tratados nos intervalos de tratamento de 8/8 horas e 12/12 horas. Entretanto nos intervalos de 24/24 horas 2 dos embriões sobreviveram até o momento da eclosão.

Para azitromicina não se observou toxicidade, todos os embriões permaneceram viáveis até o momento da eclosão. As concentrações 0,2 µg/ovo, 1,6 µg/ovo e 12,8 µg/ovo e intervalos das doses, 8/8 horas, 12/12 horas e 24/24 horas não demonstraram diferença quanto a toxicidade, podendo ser usado como posterior tratamento em ovos com pitiose.

Ao término do experimento todos os ovos foram abertos de forma asséptica e na observação dos órgãos os embriões tratados com terbinafina e itraconazol apresentavam anormalidades. O fígado apresentava ictérico, com coloração amarelada. Nenhum dos embriões tratados com azitromicina apresentava anormalidades.

6 DISCUSSÃO

Em humanos, a pitiose se desenvolve na maioria dos casos em pacientes talassêmicos e acredita-se que altos níveis de ferro podem estar relacionados a uma modulação na patogênese da doença (ZANETTE, et al., 2013a; ZANETE, et al., 2013b; KRAJAEJUM, T., et al., 2006). Segundo Wanachiwanawin (2000), as alterações patológicas evoluem ao longo da parede arterial formando trombos, afetando a circulação e comprometendo membros, grande parte destes casos resulta em amputação. Humanos com pitiose também podem apresentar lesões no fígado e rins, resultando em uma doença disseminada fatal. No teste com ovos embrionados de galinha, foi possível reproduzir a infecção experimental com *P. insidiosum*, sendo confirmada por isolamento do micro-organismo, PCR e análises histopatológicas. Entre os embriões infectados com 500 zoósporos/mL, 95% (n=19) apresentaram hifas e trombos nos vasos sanguíneos, e um deles apresentou também hifas no fígado sugerindo infecção disseminada.

O modelo experimental de infecção para pitiose utilizado em testes *in vivo* é o coelho, essa espécie desenvolve lesões granulomatosas, frequentes na pitiose equina (MILLER & CAMPBELL, 1983). Não existe na literatura um modelo experimental que apresente lesões vasculares como descritas na pitiose humana. Desta forma, o ovo embrionado poderá ser utilizado como um modelo experimental *in vivo*, que auxiliará na descoberta de tratamentos mais eficazes para as infecções vasculares causadas pela pitiose.

Ovos embrionados já têm sido utilizados como modelo experimental em infecções fúngicas de *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (JACOBSEN, et al., 2010). Esse modelo é de fácil manuseio e tem auxiliado na descoberta de novos tratamentos. No modelo experimental utilizando ovos embrionados infectados com *Pythium insidiosum*, foram observados sinais histopatológicos característicos da pitiose vascular, acometendo vasos sanguíneos, com hifas e trombos, assim, foi capaz de impedir a troca de oxigênio e nutrientes com o saco vitelínico, causando a morte do embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus*). A concentração de 500 zoósporos/mL foi capaz de infectar os embriões sem causar a morte aguda, sendo que em concentrações inferiores não foram capazes de causar a infecção.

A infecção em ovos embrionados pode ocorrer em várias vias como pela CAM (membrana corioalantóide), albumina, cavidade alantoide, injeção direta no embrião ou nos vasos sanguíneos (JACOBSEN, et al., 2010). Nesse estudo a infecção foi realizada pela inoculação na cavidade alantoide em meio a vasos sanguíneos, onde está situado o saco vitelínico. Foi escolhido esse local, pois o objetivo era, além da realização da infecção, testar

tratamentos para a pitiose, assim como avaliar a toxicidade dos mesmos, sem causar morte prematura do embrião.

Várias alternativas de tratamento são utilizadas frente ao *P. insidiosum*, porém o tratamento para essa doença em humanos ainda não está bem definido, consequentemente como terapia é utilizada uma ampla variação de fármacos (WANACHIWANAWIN et al., 2004). Para testes de toxicidade com ovos embrionados de galinha foram utilizados azitromicina, itraconazol e terbinafina os quais já haviam apresentado resultados satisfatórios frente ao *P. insidiosum in vitro* (LORETO et al., 2014).

A toxicidade farmacológica pode ser influenciada por diversos fatores, tais como, idade, peso corpóreo, estados nutricionais, concentração da amostra testada, a solubilidade nos fluidos orgânicos, entre outros (BEDNARCZUK, et al., 2010). Os antifúngicos analisados, itraconazol e terbinafina, foram utilizados para posteriores testes de terapia combinada com outros fármacos, porém os resultados indicaram toxicidade, ocasionando a morte do embrião antes da eclosão, bem como icterícia hepática.

A toxicidade descrita pode ter sido causada pela utilização de embriões com apenas 14 dias de desenvolvimento, já que estes não apresentam maturação completa. Outro fator que pode ter ocasionado a toxicidade é a via de excreção embrionária, após realizada a excreção, os resíduos se mantem dentro da cavidade alantoide, acarretando o acúmulo desses fármacos e consequentemente uma sobre dose. Em contraste, a azitromicina não demonstrou toxicidade frente aos embriões.

A partir disto, um novo modelo experimental de pitiose utilizando ovos embrionados de galinha foi desenvolvido, podendo assim ser testada a eficácia de tratamentos de forma simples e rápida. Dessa forma, pode-se concluir que houve infecção experimental em ovos embrionados de galinha (95%), acometendo principalmente vasos sanguíneos, demonstrando ser um modelo experimental semelhantes a pitiose vascular.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Foi desenvolvido um novo modelo experimental *in vivo* para pitiose, utilizando ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*), demonstrando infecção em 95% dos embriões por *P. insidiosum*;

- A melhor concentração de zoósporos de *Pythium insidiosum* capaz de reproduzir a doença foi de 50 zoósporos/ovo, no 14° dia de desenvolvimento embrionário, causando infecção em cordões umbilicais de ovos embrionados de *Gallus gallus domésticos*, e consequentemente levando a morte embrionária em até 72 horas após a infecção;

- Os fármacos, terbinafina e itraconazol, e azitromicina foram testados para avaliação da toxicidade, sendo administrado 0,025 mL/ovo a cada administração, com doses administradas nos intervalos de tempo de 8/8 horas, 12/12 horas e 24/24 horas. Itraconazol e terbinafina mostraram-se tóxicos na concentração de 12,8 µg/ovo frente ao embrião. No entanto azitromicina não apresentou toxicidade nas doses de 0,2 µg/ovo, 1,6 µg/ovo e 12,8 µg/ovo e em nenhum intervalo de tempo.

REFERÊNCIAS

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

ADHIKARI, B. N. et al. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. **PloS One,** v. 8, p. e75072, 2013.

ALNASSAN, A. A. et al. Embryonated chicken eggs as an alternative model for mixed *Clostridium perfringens* and *Eimeria tenella* infection in chickens. **Parasitology Research,** v. 112, p. 2299-2306, 2013.

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

BEDNARCZUK, V. O. et al. Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural products. **Visão Academica,** v. 11, p. 43-50, 2010.

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

BERNARDO, F. D. et al. Pythiosis in sheep from Paraná, southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 35, p. 513-517, 2015.

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

BOSCO, S. M. G. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases,** v. 11, p. 715-717, 2005.

BOTTON, S.A., et al. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology,** v. 62, p. 1225-1229, 2011.

CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 49, p. 3710-3713, 2011.

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

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

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

CHAFFIN, M. K. et al. Idiopathic muscular hypertrophy of the equine small intestine: 11 cases (1980-1991). **Equine Veterinary Journal,** v. 24, p. 372-378, 1992.

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

DEBIASI, M.M. **Análise Morfológica Da Ação do Cloreto De Manganês Durante o Desenvolvimento Embrionário de *Gallus Gallus***. 2011. 51 p. Monografia, Curso de especialização em Biologia Celular e Tecidual - Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2011.

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

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

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

FOIL, C. S. **Update on pythiosis (Oomycosis)**. Orlando: Bayer Animal Health, p.57-63, 1996.

FURUTA, P. I. et al. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology,** v. 134, p. 1931-1939, 2007.

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

GABRIEL, A. L. et al. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 28, p. 583-587, 2008.

GALIZA, G. J. N. et al. Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 34, p. 224-232, 2014.

GILBERT, SCOTT F. **Biologia do desenvolvimento**. 5ª edição. FUNPEC editora. Ribeirão Preto - SP, 2003.

GOODPASTURE, E. W.; ANDERSON, K. The Problem of Infection as Presented by Bacterial Invasion of the Chorio-Allantoic Membrane of Chick Embryos. **American Journal of Pathology,** v. 13, p. 149-174.147, 1937.

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

HENSEL, P. et al. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 223, p. 215-218, 197, 2003.

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

HUBERT, JEREMY D.; GROOTERS, AMY M. Treatment of equine pythiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, p. 812-815, 2002.

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

JACOBSEN, I. D.; GROSSE, K.; HUBE, B. Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. **Methods in Molecular Biology,** v. 845, p. 487-496, 2012.

JACOBSEN, I. D. et al. Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. **Infection and Immunity,** v. 78, p. 2995-3006, 2010.

JESUS, F. P. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 58, p. 5621-5625, 2014.

JESUS, F. P. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale,** v. 25, p. e89-93, 2015a.

JESUS, F. P. et al. In vitro and in vivo antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 60, p. 87-91, 2015b.

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

LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. **Vascular,** v. 17, p. 234-238, 2009.

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

LEVESQUE, C. A.; DE COCK, A. W. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research,** v. 108, p. 1363-1383, 2004.

LORETO, E. S. et al. New insights into the in vitro susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 58, p. 7534-7537, 2014.

MAHL, D. L. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 56, p. 4021-4023, 2012.

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

MCMULLAN, W. C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 170, p. 1293-1298, 1977.

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

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

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

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

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

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,** v. 4, 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, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal,** v. 57, p. 377-382, 1981.

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

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

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. Immunological studies on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal,** v. 58, p. 227-231, 1982b.

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

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

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

MOCHALOVA, L. et al. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. **Virology,** v. 313, p. 473-480, 2003.

PAIM. A.C. A grande inovação dos répteis: o ovo amniótico ou reptiliano. [**Postagem disponibilizada em 19 de maio de 2016, a Internet]**. Disponível em: http://segundocientista.blogspot.com.br/2015/08/a-grande-inovacao-dos-repteis-o-ovo.html. Acesso em 12 de janeiro de 2017.

PEREIRA, D. I. et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia,** v. 176, p. 309-315, 2013.

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

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

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

ROCHA, V., Ovos galados- uma alternativa viável para o pequeno avicultor. [**Entrevista disponibilizada em 12 de setembro de 2014, a Internet**]. Disponível em: http://www.criargalinha.com.br/genetica/ovos-galados/. Acesso em 12 de janeiro de 2017.

ROSA, P. S., NEWTON, J. C., & TRICHE, P. **An ELISA test to detect *Pythium insidiosum* infection in horses.** 1999. In Congresso Brasileiro De Microbiologia. vol. 20, p. 151. Salvador, Sociedade Brasileira de Microbiologia.

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

SANTOS, A. M. **Rinite por *Conidiobolus sp. e Pythium insidiosum* em ovinos: aspectos clínicos, epidemiológicos e radiográficos.** 2010. 35 p. Monografia, Curso de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Campina Grande, Patos- PB, 2010.

SANTOS, C. E. P. D., SANTURIO, J. M., & MARQUES, L. C. Pitiose em animais de produção no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31,p. 1083-1089, 2011.

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

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

SANTURIO, J. M.; LEAL, A. T.; MONTEIRO, A. B. Pythiose. **Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires de Bétail, Lavoisier, Paris**, p. 1231-1241, 2003b.

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

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

SATHAPATAYAVONGS, B. et al. Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. **Journal of Infectious Diseases,** v. 159, p. 274-280, 1989.

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

SMITH, F. The pathology of bursattee. **Veterinary Journal,** v. 19, p. 16-17, 1884.

SUDJARITRUK, T.; SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases,** v. 11, p. 33, 2011.

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

TUMPEY, T. M. et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. **Science,** v. 310, p. 77-80, 2005.

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

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology,** v. 50, p. 219-224, 2012.

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

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

WOLPERT. L. *et al.* **Princípios de Biologia do Desenvolvimento.**: 1ª edição, Artmed, Porto Alegre, 2000.

XIA, H. et al. Infection and propagation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in embryonated chicken eggs. **Virus Research,** v. 173, p. 344-349, 2013.

ZANETTE, R. A. et al. Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiology and Immunology,** v. 57, p. 732-735, 2013a.

ZANETTE, R. A. et al., Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model. J **Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 1144–7, 2013 b.