

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

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS
IMUNODOMINANTES DE *PYTHIUM INSIDIOSUM*
RECONHECIDOS POR ANTICORPOS DE EQUÍNOS,
COELHOS E BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Patrícia Bernardes Cavalheiro

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS IMUNODOMINANTES
DE *PYTHIUM INSIDIOSUM* RECONHECIDOS POR
ANTICORPOS DE EQÜINOS, COELHOS E BOVINOS**

por

Patrícia Bernardes Cavalheiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2010

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

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

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS IMUNODOMINANTES DE
PYTHIUM INSIDIOSUM RECONHECIDOS POR ANTICORPOS DE
EQÜINOS, COELHOS E BOVINOS**

elaborada por
Patrícia Bernardes Cavalheiro

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)**

Janio Morais Santurio, Dr. (UFSM)

Daniela Isabel Brayer Pereira, Dr^a (UFPeI)

Santa Maria, 26 de julho de 2010.

Dedicatória

À minha mãe, Jane, pelo amor e dedicação incondicionais e ao meu pai, Itacir, pelo amor, incentivo e orgulho que se fizeram presentes mesmo na sua ausência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por sempre guiar o meu caminho e por mais este ideal alcançado.

Aos meus pais, meu exemplo de vida, de dignidade, de caráter e principalmente pelo amor incondicional. Muito obrigada por sempre me apoiarem e incentivarem a nunca desistir dos meus objetivos.

A toda minha família, pelo amor, dedicação, companheirismo, compreensão e pelos valores transmitidos a mim.

Ao meu namorado, Marcos, pelo companheirismo, amor, incentivo e por me dar força nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Sydney, meu orientador, muito obrigada pela amizade, ensinamentos, sinceridade e pelas oportunidades que me proporcionou. Sou muito grata por tudo o que fizeste por mim.

À Prof.^a Valéria, minha co-orientadora, por confiar em mim e estar sempre pronta para me ajudar. Agradeço pela amizade, paciência, ensinamentos e colaboração fundamental neste trabalho.

Ao Prof. Jânio Santurio, pelos conselhos e por todo o conhecimento transmitido, os quais contribuíram fundamentalmente para a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que contribuíram para a minha formação.

A todos os colegas do LAPEMI, em especial ao Régis, Bel e Camila, que me ajudaram inúmeras vezes. Muito obrigada pela amizade e compreensão. Ao amigo Jeandre, que sempre estava disposto a me auxiliar em todas as situações, que muito aprendeu e também muito me ensinou. Muito obrigada.

Aos meus amigos do “peito”, aqueles que caminham comigo e também aqueles que nem sempre podem estar perto, mas que nem por isso deixam de habitar, por vezes, os meus pensamentos, agradeço pela amizade, companheirismo, dedicação e sinceridade nas palavras.

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade de fazer a leitura e a avaliação desta dissertação.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade de realização deste curso.

Ao CNPq pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS IMUNODOMINANTES DE *PYTHIUM INSIDIOSUM* RECONHECIDOS POR ANTICORPOS DE EQUÍNOS, COELHOS E BOVINOS

AUTORA: PATRÍCIA BERNARDES CAVALHEIRO

ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 26 de julho de 2010.

O oomiceto *Pythium insidiosum* é o agente etiológico da pitiose, doença granulomatosa crônica que afeta animais domésticos (equínos, bovinos, etc) e o homem, em regiões tropicais e subtropicais de todo mundo. A ausência de ergosterol na membrana plasmática deste microorganismo torna a antifungoterapia muito limitada, donde a imunoterapia (a base de hifas rompidas) tem emergido com resultados promissores. A identificação de antígenos imunodominantes é fundamental para a consolidação dos imunoterápicos utilizados no tratamento da pitiose. Objetivando-se o refinamento destes imunoterápicos, o presente estudo teve como proposta inicial, caracterizar os antígenos imunodominantes desta espécie (*P. insidiosum* ATCC 58637 e *P. insidiosum* 210-LAPEMI) através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Diversas proteínas de 120 a 15 kDa foram detectadas e, a seguir, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose para realização de western blot. O segundo objetivo foi caracterizar a resposta humoral à doença em equínos, bovinos e na infecção experimental em coelhos, considerando-se a doença curada pela imunoterapia, doença tratada pela imunoterapia e não curada, doença não tratada, e na doença evidenciando cura espontânea. Para tanto, utilizou-se o soro de: a) equínos doentes e curados pela imunoterapia; b) equínos doentes e sem resposta a imunoterapia; c) equínos doentes e não tratados; d) bovinos doentes e com cura espontânea; e) coelhos infectados e tratados pela imunoterapia; f) coelhos infectados e não tratados. Todos os soros reconheceram três proteínas imunodominantes: 74, 33 e 32 kDa. O soro dos equínos doentes curados pela imunoterapia (a) e o soro dos bovinos (d) reconheceram também outra proteína imunodominante de 55 kDa, a qual, foi fracamente reconhecida ou ausente nos demais grupos. Assim, comprova-se que as proteínas de 74, 33 e 32 kDa desempenham relevante papel na resposta imune à pitiose, pois foram imunogênicas nas três espécies avaliadas. Em adição, sugere-se que a proteína de 55 kDa possa estar envolvida no mecanismo de cura promovido pela imunoterapia; ressalta-se que esta proteína é aqui pela primeira vez relatada.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*; imunoterapia; proteínas imunodominantes.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Program Post-Graduate in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

CHARACTERIZATION OF IMMUNODOMINANT ANTIGEN OF *PYTHIUM INSIDIOSUM* RECOGNIZED BY ANTIBODIES OF HORSES, RABBITS AND CATTLE

AUTHOR: PATRÍCIA BERNARDES CAVALHEIRO

ADVISER: SYDNEY HARTZ ALVES

Place and Date of the Defense: Santa Maria, July 26th, 2010.

Oomycete *Pythium insidiosum* is the etiologic agent of pythiosis, chronic and granulomatous disease, which affects humans and animals in tropical and subtropical areas of the world. Due to ergosterol absence in the plasmatic membrane of this microorganism, treatments based on antifungal agents have been ineffective. Immunotherapy has emerged showing promising results. In this context, the improvement of the immunotherapy was the main goal of this study, whose first purpose was to characterize the immunodominant antigens from this species (*P. insidiosum* ATCC 58637 and *P. insidiosum* 210-LAPEMI) through sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE). Some proteins showing 15 kDa to 120 kDa were detected, and bands were transferred to nitrocellulose membranes in order to develop the western blot tests. The second purpose was to characterize the humoral response to pythiosis in equine, in bovine and in experimental pythiosis in rabbits, considering the no treated disease, the disease cured by immunotherapy, the disease treated with immunotherapy but not cured, and the disease cured spontaneously. To encompass all these cases we have included sera from: a) horses cured by immunotherapy; b) horses with pythiosis but not responsive to immunotherapy; c) horses with pythiosis but not treated; d) bovines with pythiosis and showing spontaneous cure; e) rabbits with experimental pythiosis but not treated; and f) rabbits with experimental pythiosis treated with immunotherapy. All specimens recognized three immunodominant proteins: 74, 33 and 32 kDa. The sera from horses cured by immunotherapy (a) and bovine sera (d) recognized another immunodominant protein, 55 kDa, which was weakly positive or negative in the other groups. Thus, the 74, 33 and 32 kDa immunodominant proteins suggest a relevant function in the humoral response to pythiosis because they were recognized by horses, rabbits and bovines. In addition, the 55 kDa antigen, which is being reported here for the first time, is likely to be involved in the cure mechanisms stimulated by immunotherapy.

Keywords: *Pythium insidiosum*; immunotherapy; immunodominant proteins

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURA 1 - Análise eletroforética de extratos protéicos de cepas de *Pythium insidiosum* em gel de poliacrilamida corado com azul brilhante de coomassie. PM- Marcador de peso molecular; A- cepa padrão de *P. insidiosum* ATCC 58637; B- *P. insidiosum* 210-LAPEMI. 65

FIGURA 2 - Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* sondados com soros de eqüinos curados pós-imunoterapia. Colunas 1, 2 e 3: proteínas imunodominantes da cepa padrão de *P. insidiosum* ATCC 58637; Colunas 4, 5, 6 e 7: proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* 210-LAPEMI; PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes para ambas as cepas de *P. insidiosum* analisadas. 66

FIGURA 3 - Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* sondados com soros de eqüinos que não desenvolveram cura pós-imunoterapia. Colunas 1, 2, 3 e 4: proteínas imunodominantes da cepa padrão de *P. insidiosum* ATCC 58637; Colunas 5, 6, 7 e 8: proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* 210-LAPEMI; PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes para ambas as cepas de *P. insidiosum* analisadas. 67

FIGURA 4 - Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* 210-LAPEMI sondados com soros de coelhos tratados e sem tratamento. Colunas 1, 3, 5 e 7: sondagem da membrana com soros de animais pré-imunoterapia; Colunas 2, 4, 6 e 8: sondagem da membrana com soros de animais pós-imunoterapia; Colunas 9, 10 e 11: sondagem da membrana com soros de animais inoculados experimentalmente com zoósporos de *P. insidiosum* e sem imunização (controle positivo); PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais

proteínas imunodominantes de aproximadamente 74, 33 e 32 kDa.
..... 68

FIGURA 5 - Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* ATCC 58637 (cepa padrão) sondados com soros de coelhos pré-imunoterapia e tratados. Colunas 1, 3, 5, 7 e 9: sondagem da membrana com soros de animais pré-imunoterapia; Colunas 2, 4, 6, 8 e 10: sondagem da membrana com soros de animais pós-imunoterapia; PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes de aproximadamente 250, 110, 74, 55, 33 e 32 kDa.
..... 69

FIGURA 6 - Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* sondados com soros de bovinos. Colunas 1, 2 e 3: proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* ATCC 58637; Colunas 5, 6 e 7: proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* 210-LAPEMI (cepa de campo); Colunas 4 e 8: controles negativos; PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes para ambas as cepas de *P. insidiosum* analisadas: 74, 55, 33 e 32 kDa. 70

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

TABELA 1 - Proteínas imunodominantes reconhecidas pelos anticorpos de eqüinos, coelhos e bovinos com pitiose pré e pós-imunoterapia	71
--	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
APRESENTAÇÃO.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Histórico e classificação.....	16
2.2 <i>Pythium insidiosum</i> : características morfológicas, reprodutivas e epidemiológicas.....	18
2.3 Pitiose.....	19
2.4 Tratamento.....	26
2.5 Imunoterapia.....	29
2.6 Diagnóstico.....	35
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	43
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	44
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÕES.....	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

O *Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático pertencente ao reino *Stramenopila*, filo *Oomycota*, família *Pythiaceae*, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Esta é a única espécie de *Pythium* que causa doença infecciosa, a pitiose, em animais e humanos, principalmente em países de clima tropical e subtropical (KRAJAEJUN *et al.*, 2002). Há relatos da doença na Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua - Nova Guiné, Tailândia, Estados Unidos (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996), Venezuela (PÉREZ *et al.*, 2005) e África (RIVIERRE *et al.*, 2005). A pitiose é descrita acometendo cães, gatos, cavalos, bovinos e humanos, porém, a maioria dos relatos descreve a doença em eqüinos (FOIL, 1996; MENDOZA; NEWTON, 2005).

A pitiose em eqüinos manifesta-se com lesões ulcerativas, proliferativas e piogranulomatosas envolvendo, na maioria das vezes, pele e tecido subcutâneo das pernas e parede ventral (MILLER; CAMPBELL, 1984). Também existem relatos da doença acometendo os pulmões (GOAD, 1984), ossos (MENDOZA; ALFARO; VILLALOBOS, 1988; ALFARO; MENDOZA, 1990) e intestino (BROWN; ROBERTS, 1988a; ALLISSON; GILLIS, 1990) de eqüinos. As lesões da pitiose acometendo eqüinos são constituídas por tecido granulomatoso, apresentando “*sinus*” dentro dos quais desenvolvem-se pequenas massas semelhantes a corais, conhecidas como “*kunkers*”, os quais são formados por eosinófilos degranulados intercalados com hifas viáveis de *P. insidiosum*, sendo encontrados somente na pitiose eqüina (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996).

Em bovinos, a doença foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos (MILLER; OLCOTT; ARCHER, 1985b). No Brasil, há um relato da doença de forma esporádica afetando poucos animais no Pantanal Matogrossense (SANTURIO *et al.*, 1998), e dois surtos foram recentemente relatados no Rio Grande do Sul (GABRIEL *et al.*, 2008; GRECCO *et al.*, 2009), sendo registrada a cura espontânea das lesões, assim como nos casos relatados no Pantanal. A pitiose acometendo humanos apresenta-se como uma doença marcada por altos índices de morbidade e mortalidade (KRAJAEJUN *et al.*, 2006a), apresentando-se nas formas subcutânea,

disseminada e como ceratite (IMWIDTHAYA, 1994). A maioria dos casos de pitiose em humanos ocorre na Tailândia (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996), porém, casos de pitiose humana também têm sido descritos em outros países, inclusive no Brasil (BOSCO *et al.*, 2005). Até o momento, ainda não foram descritos casos de infecção natural por *P. insidiosum* em coelhos, entretanto, alguns pesquisadores demonstraram que os coelhos são suscetíveis à infecção experimental (MILLER; CAMPBELL, 1983b) e que a resposta à imunoterapia pode ser facilmente monitorada nesta espécie animal, quando utilizada como modelo experimental (SANTURIO *et al.*, 2003).

O tratamento da pitiose em animais e humanos é limitado pelas peculiaridades do agente etiológico, notadamente a ausência de ergosterol na membrana plasmática, componente alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas. Com isso, os agentes antifúngicos são ineficientes e a maioria dos animais atingidos, não sobrevive à infecção (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). MILLER, em 1981, desenvolveu a imunoterapia como uma nova alternativa para o tratamento da infecção em eqüinos, proporcionando um avanço significativo no controle da doença. Nas décadas de 80 e 90, vários autores utilizaram a imunoterapia no tratamento da pitiose eqüina, obtendo índices de cura variados (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA *et al.*, 1992a; MONTEIRO, 1999). No Brasil, MONTEIRO (1999) descreveu a utilização de um imunoterápico (PITIUM-VAC[®]), relatando índices de cura em torno de 50% para os casos crônicos e em torno de 80% para os casos recentes da doença.

Diversos estudos avaliando a resposta imunológica à pitiose em cavalos, bovinos e humanos já foram realizados (MENDOZA; NICHOLSON; PRESCOTT, 1992b; LEAL *et al.*, 2005; KRAJAEJUN *et al.*, 2006b; CHINDAMPORN *et al.*, 2009; KRAJAEJUN *et al.*, 2010); entretanto, a definição dos antígenos específicos que realmente induzem à resposta imune diferenciada, capaz de promover a cura da doença, ainda requer avaliação. Neste contexto, a identificação de tais antígenos, permitirá futuros estudos para sua purificação e inclusão no imunoterápico, o que poderá representar significativo avanço na terapêutica desta infecção. Todavia, o primeiro passo, constitui-se no reconhecimento destes antígenos imunodominantes, bem como caracterizar a resposta humoral dos animais aos mesmos. Este estudo foi objetivado a realizar estes passos preliminares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico e classificação

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum* é o agente etiológico da pitiose. Os primeiros relatos sobre a pitiose, provavelmente, foram feitos por SMITH, em 1884, e DROUIN, em 1896, os quais observaram a natureza micelial do agente etiológico, porém, embora o organismo pudesse ser cultivado, não foi possível identificá-lo, pois este não esporulava. Em 1901, DE HAAN e HOOGKAMER fizeram uma extensa descrição de alguns casos da doença em cavalos na Indonésia e a nomearam de *Hyphomycosis destruens*. Esse nome foi ampliado por DE HAAN, em 1902, para *Hyphomycosis destruens equi*. BRIDGES e EMMONS, em 1961, nomearam o agente etiológico da doença de *Hyphomyces destruens*, o qual foi considerado um ficomiceto, com base em sua morfologia quando isolado de tecido eqüino, apresentando um micélio composto por hifas largas, bastante ramificadas, esparsamente septadas, com ausência de esporulação nas culturas (apud DE COCK *et al.*, 1987).

AUSTWICK e COPLAND, em 1974, relataram que os isolados obtidos de cavalos infectados em Papua, Nova Guiné, formavam zoósporos biflagelados. A formação dos zoósporos ocorreu quando os isolados desenvolveram-se no ágar Sabouraud dextrose e foram transferidos para água estéril contendo fragmentos de silagem de milho. A partir dessa característica, os autores classificaram o *H. destruens* como um ficomiceto pertencente a família *Pythiaceae*, ordem *Peronosporales* e que poderia ser incluído no gênero *Pythium*. Em 1980, ICHITANI e AMEMIYA isolaram uma espécie de *Pythium* a partir de um eqüino japonês com pitiose. Baseando-se em características reprodutivas, os autores concluíram que esse isolado tratava-se da espécie *Pythium gracile* Schenk (apud DE COCK *et al.*, 1987).

DE COCK *et al.*, em 1987, realizaram um estudo morfológico comparativo, utilizando culturas vivas a partir de isolados de *Pythium* de cavalos da Costa Rica, de Papua - Nova Guiné, dos Estados Unidos e do Japão, e isolados de cães dos

Estados Unidos, além de isolados do mesmo agente, porém, de outras espécies. Esses isolados foram semeados em diversos meios para a observação de suas características morfológicas e reprodutivas. Os estudos morfológicos comparativos mostraram que os isolados de cavalos e cães representavam uma única espécie e que esta era distinta das outras espécies conhecidas, sendo denominada de *Pythium insidiosum*. Também foi possível concluir que essa nova espécie era igual àquelas anteriormente descritas por BRIDGES e EMMONS (1961), AUSTWICK e COPLAND (1974) e ICHITANI e AMEMIYA (1980): *Hyphomyces destruens*, *Pythium sp* e *Pythium gracile*, respectivamente. Segundo esses autores, os oomicetos são seres eucariotas produtores de zoósporos biflagelados, característica comum ao *P. insidiosum*, incluindo-o na ordem *Peronosporales*, filo *Oomycota* e reino *Protista* (DE COCK *et al.*, 1987).

Em 1989, MENDOZA e MARIN realizaram provas sorológicas utilizando anti-soro produzido em coelhos e soro de eqüinos com pitiose frente a antígenos de cepas de *P. insidiosum* e antígenos de *P. destruens*, espécie reconhecida por SHIPTON, em 1987 (apud MENDOZA; MARIN, 1989), em um estudo analisando um isolado de eqüino. A partir desse estudo, os autores reconheceram a semelhança antigênica entre as duas espécies, determinando que tratavam-se do mesmo agente, sendo estabelecida a nomenclatura definitiva de *Pythium insidiosum* para o agente causador da pitiose (MENDOZA; MARIN, 1989).

Embora o nome do agente tenha sido estabelecido, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes. MENDOZA, AJELLO e MCGINNIS apresentaram o *P. insidiosum* como um organismo do reino *Chromista*, filo *Pseudo-fungi*, classe *Oomycetes*, ordem *Pythiales*, e família *Pythiaceae* (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Contudo, alguns estudos sobre a classificação dos fungos, baseados em sistemática filogenética e análises moleculares, entre outros, dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: *Fungi*, *Stramenopila* e *Protista*. A partir dessa nova classificação, concluiu-se que o agente etiológico da pitiose pertence ao reino *Stramenopila*, filo *Oomycota*, classe *Oomycetes*, ordem *Pythiales*, família *Pythiaceae*, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

2.2 *Pythium insidiosum*: características morfológicas, reprodutivas e epidemiológicas

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático, classificado no reino *Stramenopila*, filo *Oomycota*, família *Pythiaceae*, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum*. Esse gênero apresenta mais de 120 espécies, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Apenas *Pythium insidiosum* é patogênico para mamíferos, uma vez que causa pitiose, uma doença granulomatosa cutânea, gastrointestinal ou sistêmica, que acomete animais e humanos (FOIL, 1996; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996).

A identificação das espécies de *Pythium* baseia-se principalmente nas características morfológicas dos zoosporângios, zoósporos, oogônia e anterídio (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). DE COCK *et al.* (1987), em um estudo utilizando isolados de animais com pitiose de diferentes partes do mundo, semearam estes isolados em diferentes meios, inclusive em água destilada, e observaram que o zoosporângio só foi produzido nas culturas em água destilada. Esses zoosporângios formam-se nas extremidades das hifas, e através de segmentação progressiva, zoósporos biflagelados formam-se no interior dos zoosporângios, sendo posteriormente liberados. Foram observadas hifas, crescidas no ágar fubá, medindo de 4 a 6 µm de diâmetro, com ramificações perpendiculares e esparsamente septadas.

Em 1983, foi proposto um ciclo ecológico para descrever o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa desse organismo. O ciclo baseia-se na colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução assexuada do organismo, formando os zoosporângios. Os zoósporos livres na água, movimentam-se até encontrar outra planta (ou animal), onde encistam-se e emitem tubo germinativo, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo (MILLER, 1983, apud SANTURIO *et al.*, 2006a). Análises *in vitro* demonstraram a atração dos zoósporos por pêlos, tecidos animais e vegetais, sendo a quimiotaxia atribuída a algumas substâncias presentes nesses tecidos. Uma substância amorfa é liberada pelo zoósporo após o seu encistamento, a qual provavelmente é produzida em resposta ao fator quimiotático do hospedeiro; essa substância agiria como um adesivo para ligar o zoósporo a superfície do hospedeiro

e permitir a formação de tubo germinativo. Essas observações sustentaram a teoria de infecção, sugerindo que os cavalos em contato com águas contaminadas poderiam atrair os zoósporos, os quais germinariam a partir de uma pequena lesão cutânea (MENDOZA *et al.*, 1993).

As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema. Para haver a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e o acúmulo de água em banhados e lagoas. A grande maioria dos casos de pitiose foi observada durante ou após a estação chuvosa. Baseado nos dados epidemiológicos, acredita-se na existência de um período de incubação de várias semanas. No Pantanal brasileiro, a maioria dos casos de pitiose eqüina é registrada entre os meses de fevereiro e maio (verão-outono), período que corresponde ao ápice das cheias (SANTURIO *et al.*, 2006a).

2.3 Pitiose

A pitiose é uma doença granulomatosa cutânea, gastrointestinal ou multissistêmica que afeta cães, gatos, cavalos, bovinos e humanos de regiões com climas tropicais, subtropicais e temperados (FOIL, 1996; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Há relatos da doença na Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua - Nova Guiné, Tailândia, Estados Unidos (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996), Venezuela (PÉREZ *et al.*, 2005) e África (RIVIERRE *et al.*, 2005).

A pitiose é uma forma de ficomicose, a qual é um complexo de doenças piogranulomatosas que também inclui a conidiobolomicose, a basidiobolomicose e doenças causadas por membros da ordem Mucorales (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995). O termo pitiose foi proposto em 1980 (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO) como um nome mais apropriado para a doença eqüina variavelmente referida como “bursatii”, “Florida horse leeches”, dermatite granular, *hyphomycosis destruens equi*, ficomicose, zigomicose, granuloma ficomicótico e “swamp cancer”.

No Brasil, a pitiose foi descrita em eqüinos, bovinos, ovinos e caninos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em eqüinos. A primeira descrição de pitiose eqüina ocorreu no Rio Grande do Sul (SANTOS;

LONDERO, 1974). Foram avaliadas amostras de 10 eqüinos através de histopatologia chegando ao diagnóstico de zigomicose subcutânea. Em 1984, no Pantanal do Mato Grosso, relatou-se a presença de lesões características de hifomicose em 13 eqüinos, sendo que de amostras de 6 desses animais, foi isolado um fungo que apresentava as mesmas características culturais e tintoriais do *Hyphomyces destruens*, o agente causador da pitiose (CARVALHO; ROSA; CRUZ, 1984). Os autores relataram que nessa região a doença era conhecida popularmente como “ferida brava”. Desde então, vários relatos da doença em diferentes estados do Brasil comprovam a existência da pitiose eqüina no país (SANTOS *et al.*, 1987; MEIRELES *et al.*, 1993; TABOSA *et al.*, 1999; RODRIGUES; LUVIZOTTO, 2000; SANAVRIA *et al.*, 2000; LEAL *et al.*, 2001a; SALLIS; PEREIRA; RAFFI, 2003; REIS *et al.*, 2003; HEADLEY; ARRUDA, 2004). Embora não exista um levantamento preciso da incidência no Brasil, a pitiose eqüina representa um problema à eqüinocultura, especialmente em regiões alagadiças como o Pantanal (LEAL *et al.*, 2001b). As condições ambientais são os fatores de maior influência para o desenvolvimento do *P. insidiosum*. O organismo requer um ambiente aquático para manter seu ciclo normal de vida, além de temperaturas em torno de 30°C e 40°C para a reprodução. Chuvas intensas e prolongadas que ocorrem nos meses de verão mantêm o meio necessário para o desenvolvimento do agente e a ocorrência de inundações pode ajudar a distribuir o organismo sobre uma área mais ampla (MILLER; CAMPBELL, 1982a).

A pitiose atinge mais comumente a espécie eqüina, principalmente com lesões na forma cutânea e subcutânea, seguida da forma gastrointestinal (LEAL *et al.*, 2001b). A susceptibilidade à infecção não está relacionada à idade, sexo ou raça dos animais (MILLER; CAMPBELL, 1982a; MENDOZA; ALFARO, 1986a; CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995; FOIL, 1996; MENDOZA; AJELLO; McGINNIS, 1996). Não existem relatos de transmissão do patógeno entre cavalos e nem entre cavalos e o homem (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995; MENDOZA; AJELLO; McGINNIS, 1996).

Inicialmente, uma lesão cutânea causada pela invasão de zoósporos de *P. insidiosum* é reconhecida devido a um inchaço local com exsudação de soro de pequenos “sinus”. As lesões cutâneas da pitiose são capazes de expandir-se de tamanho em um ritmo extremamente rápido. Em alguns dias a lesão caracteriza-se como uma massa ulcerada de tecido de granulação com “sinus” que liberam um

fluido sero-sanguinolento, hemorrágico ou algumas vezes muco-purulento. O tecido de necrose produz um odor desagradável. As lesões são severamente pruriginosas, as quais freqüentemente levam à automutilação da lesão e dos tecidos circundantes. Massas com um formato irregular, de cor amarela escura a cinza, arenosas, semelhantes a corais conhecidas como “*kunkers*” são encontradas dentro dos “*sinus*” e na superfície dos tecidos infectados. Os “*kunkers*” medem em torno de 2 a 10 mm de diâmetro e são compostos de vasos que sofreram necrose de coagulação, eosinófilos mortos e hifas de *P. insidiosum* (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995). As lesões cutâneas em geral são circulares e variam em tamanho de acordo com sua localização e duração da infecção. Essas lesões geralmente permanecem no mesmo nível da superfície da pele, mas podem tornar-se ligeiramente elevadas (MILLER; CAMPBELL, 1982a; CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995).

Histopatologicamente, nos estágios iniciais da pitiose, abundantes micro-abscessos rodeados por uma reação inflamatória composta principalmente de eosinófilos, poucos neutrófilos, linfócitos e macrófagos estão presentes em lesões subcutâneas. Em lesões crônicas, tecido granulomatoso eosinofílico com células gigantes está freqüentemente presente. Na área central da inflamação são observados “*kunkers*”. Estas massas coradas pela coloração especial de prata (Gomori's methenamine silver stain) revelam a presença de hifas esparsamente septadas, medindo de 6 a 10 µm de diâmetro associadas com restos celulares (MENDOZA; AJELLO; McGINNIS, 1996).

A pitiose cutânea eqüina afeta em geral as extremidades distais, o abdômen e o tórax, presumivelmente porque estas áreas estão mais em contato prolongado com águas infectadas (MILLER; CAMPBELL, 1982a; CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995). Ocasionalmente, lesões cutâneas podem desenvolver-se na genitália externa, pescoço, tronco ou na mediana dorsal (MILLER; CAMPBELL, 1982a; MENDOZA; ALFARO, 1986a; CHAFFIN; SCHUMACHER; HOOPER, 1992). Geralmente, a pitiose consiste em uma única lesão na pele ou tecido subcutâneo (MURRAY *et al.*, 1978; MILLER; CAMPBELL, 1982a). A ocorrência de mais de duas lesões cutâneas é rara (CHAFFIN; SCHUMACHER; HOOPER, 1992).

A pitiose é tipicamente restrita a pele e ao tecido subcutâneo, mas em cavalos infectados de forma crônica, quando a infecção não é controlada, o *P. insidiosum* pode destruir estruturas profundas rapidamente, propagando-se para áreas distantes

do corpo através dos linfáticos (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995). O organismo pode invadir o trato intestinal (BROWN; ROBERTS, 1988a; ALLISSON; GILLIS, 1990), pulmões (GOAD, 1984), traquéia e linfonodos (MURRAY *et al.*, 1978; MILLER; CAMPBELL, 1984). Os sinais clínicos da doença metastática referem-se aos sítios da infecção. Um cavalo desenvolveu uma tosse e uma descarga nasal com sangue causada por pitiose pulmonar um ano após um tratamento bem sucedido de uma lesão por pitiose em uma extremidade distal (GOAD, 1984). Pitiose entérica tem sido associada com sinais de cólica intermitente (BROWN; ROBERTS, 1988a; ALLISSON; GILLIS, 1990).

Em cavalos infectados de forma crônica, o *P. insidiosum* pode invadir o osso subjacente. Em adição aos sinais associados com as lesões cutâneas, cavalos com envolvimento ósseo apresentam claudicação em função da dor associada à osteomielite (MENDOZA; ALFARO; VILLALOBOS, 1988; ALFARO; MENDOZA, 1990).

Os cães são a segunda espécie mais afetada pela pitiose (SANTURIO *et al.*, 2006a) e a maioria dos relatos envolve o trato gastrintestinal (MILLER; QUALLS; TURNWALD, 1983a; MILLER, 1985a). Infecção pelo *P. insidiosum* em cães foi relatada pela primeira vez em animais com lesões cutâneas e gastrintestinais, em uma região próxima ao Golfo do México nos Estados Unidos (MENDOZA; AJELLO; McGINNIS, 1996). A pitiose canina é freqüentemente observada em animais com menos de três anos, machos, de raças de grande porte (MILLER, 1985a), criados fora de casa e com histórico recorrente de exposição a ambientes quentes e alagados, como pântanos e lagos. Apesar disso, em uma porcentagem significativa de cães, não há informações sobre exposição a ambientes com essas características, ocorrendo casos de pitiose em áreas suburbanas (GROOTERS, 2003).

A pitiose gastrintestinal canina caracteriza-se pela presença de anorexia crônica, perda de peso, vômito e diarreia (FISCHER *et al.*, 1994). A formação de massas granulomatosas gastrintestinais, áreas de espessamento mural e ulceração da mucosa gastrintestinal são comuns. É observada uma grave inflamação piogranulomatosa multifocal na mucosa, submucosa, musculatura estomacal, piloro e intestino delgado, com raro envolvimento do mesentério, linfonodos mesentéricos e pâncreas. Os piogranulomas consistem, tipicamente, de focos de necrose infiltrados e cercados por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células plasmáticas e

células gigantes multinucleadas (FISCHER *et al.*, 1994; MENDOZA; AJELLO; McGINNIS, 1996). RODRIGUES *et al.* relataram o caso de um cão macho, com dois anos de idade, da raça Labrador Retriever encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria (HV-UFSM), por causa de vômitos, diarreia e perda de peso. No exame clínico, foi constatada uma massa palpável na cavidade abdominal, confirmada por laparotomia exploratória, sendo que o diagnóstico de pitiose foi determinado por isolamento do agente (RODRIGUES *et al.*, 2006).

A pitiose acometendo gatos é rara. Um caso de pitiose em gatos foi relatado por BISSONNETTE *et al.* Os animais apresentavam um edema facial, mas sem o envolvimento de órgãos internos. O diagnóstico foi estabelecido a partir da utilização de antiglobulinas específicas contra *P. insidiosum*, marcadas com fluoresceína, detecção de anticorpos contra *P. insidiosum* através de um teste de imunodifusão, e isolamento do agente etiológico a partir de cultura do tecido infectado (BISSONNETTE *et al.*, 1991). No sudeste dos Estados Unidos foram relatados dois casos de pitiose gastrointestinal em gatos, com diagnóstico confirmado pelo método de imunoperoxidase (RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005).

A pitiose em bovinos também é rara, sendo que o primeiro relato da doença nesta espécie foi feito por MILLER, OLCOTT e ARCHER (1985b), sendo conhecidos mais dois casos (SANTURIO *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2005). A partir das informações dos três relatos, não há aparente predisposição por sexo e a maioria dos animais afetados é jovem. As lesões macroscópicas caracterizam-se por espessamentos dérmicos ulcerados, multifocais, de tamanhos variados, localizados principalmente nos membros. Algumas lesões não são ulceradas ou apresentam tratos fistulosos com material serossanguinolento ou purulento. Histologicamente observam-se múltiplos granulomas dérmicos discretos, áreas de necrose multifocal e tecido fibroso circundando os granulomas. Há poucas hifas fracamente coradas no centro dos granulomas e no interior de células gigantes multinucleadas (GABRIEL *et al.*, 2008). Uma diferença macroscópica marcante da pitiose bovina em relação à eqüina está na ausência dos “kunkers” (SANTURIO *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, novos relatos de casos da doença em bovinos têm sido feitos. GABRIEL *et al.* (2008) relataram a ocorrência de um surto de pitiose afetando 76 bovinos em uma propriedade do oeste do Rio Grande do Sul. Os achados histopatológicos observados neste e nos demais relatos de pitiose bovina revelam

inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa, diferindo das lesões observadas em eqüinos, onde há intenso infiltrado eosinofílico formando extensos focos de eosinófilos necróticos (“*kunkers*”), circundadas por tecido de granulação (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995). Recentemente, GRECCO *et al.* (2009) descreveram a ocorrência de pitiose cutânea em 16 bovinos de uma propriedade do município de Capão do Leão, também no Rio Grande do Sul. Em ambos os relatos, os animais apresentaram a doença nos meses de verão, com lesões cutâneas em regiões do corpo que ficavam grande tempo em contato com águas de regiões alagadas, sendo que estas lesões apresentaram características histopatológicas muito semelhantes. Os dois autores, assim como SANTURIO *et al.* (1998), registraram a cura espontânea das lesões, em um período variável de poucas semanas a dois meses.

Em humanos, a maioria dos casos ocorre na Tailândia, com alguns poucos relatos de casos na Austrália, Haiti, Nova Zelândia e Estados Unidos (MENDOZA; AJELLO; McGINNIS, 1996). Os primeiros casos de pitiose humana na Tailândia foram relatados em 1985, apresentando-se como lesões subcutâneas em dois homens talassêmicos provenientes de áreas rurais (IMWIDTHAYA, 1994). Desde então, vários casos humanos foram relatados, e a doença é marcada por elevada morbidade e mortalidade (KRAJAEJUN, 2006a). As infecções por *P. insidiosum* em humanos, podem apresentar-se de três formas. A primeira forma são lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos; a segunda é a forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos e a terceira forma caracteriza-se por ceratite, podendo ou não ser associada à talassemia. Além disso, as lesões podem-se apresentar na região periorbital e o aspecto histopatológico é similar ao das infecções em eqüinos (LEAL *et al.*, 2001b; SANTURIO *et al.*, 2006a).

A evolução habitualmente é grave, com índice de óbito de 47% naqueles com comprometimento vascular, expressa, em geral, por necrose de extremidades e úlceras cutâneas crônicas (MARQUES *et al.*, 2006). Em função de a Tailândia ser um país essencialmente agrícola, com extensas áreas alagadiças, e devido a alta prevalência da talassemia em sua população, a pitiose humana desempenha um importante papel nesse país (IMWIDTHAYA, 1994).

Em 1989, SATHAPATAYAVONGS *et al.* relataram cinco casos de pitiose sistêmica na Tailândia, sendo que todos os pacientes eram talassêmicos e provenientes de áreas rurais. Os pacientes sofriam de dor e edema das extremidades em função da inflamação arterial crônica, além de oclusão pela invasão do organismo, a qual resultou em gangrena e aneurisma. Desses cinco casos, dois evoluíram para a ruptura fatal da aorta, dois necessitaram de amputação do membro afetado e um paciente foi curado com ressecção do aneurisma (SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989). A evolução desses casos demonstra a gravidade da pitiose arterial em humanos (SANTURIO *et al.*, 2006a).

Recentemente, PUPAIBOOL *et al.* registraram dois casos de pitiose em pacientes talassêmicos na Tailândia. Um dos pacientes tratava-se de uma mulher de 63 anos, a qual manteve contato, durante várias semanas, com as águas de uma inundação, desenvolvendo, posteriormente, dor e claudicação no pé direito, culminando com incapacidade de caminhar. No momento da internação, verificou-se que a paciente apresentava obstrução completa de algumas artérias importantes, inclusive a aorta. Seu quadro clínico piorou, com necrose progressiva de feridas e gangrena dos membros ditando múltiplos debridamentos e posteriores amputações, evoluindo para a morte dois meses após sua admissão. O outro paciente era um menino de quinze anos, o qual relatou o contato freqüente com águas de uma lavoura de arroz. Seis dias antes da admissão hospitalar, o menino apresentou celulite necrozante em ambos os membros inferiores, não respondendo a agentes antimicrobianos intravenosos, sendo que no momento da internação, em função da gravidade das lesões, foi necessário o debridamento cirúrgico. As lesões apresentavam necrose da pele e tecido subcutâneo, mas com fáscias e músculos intactos. O paciente recebeu tratamento com uma combinação de iodeto de potássio supersaturado (SSKI), itraconazol e terbinafina, além de outros dois episódios de debridamento cirúrgico e enxerto de pele, e após quase três meses de internação recebeu alta. Anticorpos séricos para *P. insidiosum* foram detectados por imunodifusão em ambos os casos (PUPAIBOOL *et al.*, 2006).

No Brasil, o primeiro relato de pitiose humana foi feito por BOSCO *et al.*, em 2005. Um homem, apresentando uma lesão cutânea no membro inferior esquerdo, afirmou que uma pequena pústula desenvolveu-se uma semana depois de uma pescaria em um lago de águas paradas. A biópsia da lesão mostrou uma inflamação granulomatosa supurativa associada a diversas hifas não-septadas, uma descoberta

que levou ao diagnóstico de zigomicose. O diagnóstico definitivo de pitiose foi determinado por análise molecular.

Foram realizadas diversas tentativas de reproduzir experimentalmente a pitiose nas espécies naturalmente infectadas, porém, nenhuma obteve sucesso (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). No entanto, WITKAMP, em 1924, foi o primeiro pesquisador a demonstrar a susceptibilidade de coelhos como modelo experimental para a pitiose, através da injeção intraperitoneal ou intravenosa de hifas do *P. insidiosum* isoladas de eqüinos com pitiose cutânea, encontrados na Índia, relatando o mesmo resultado após a introdução de “kunkers”, recuperados dos cavalos infectados, em tecidos de coelho (apud MENDOZA; NEWTON, 2005).

MILLER e CAMPBELL, em 1983, demonstraram pela primeira vez a reprodução da infecção através da utilização de zoósporos como unidades infectantes. Foram utilizados coelhos saudáveis e coelhos tratados com cortisona. Os pesquisadores observaram que não ocorreu diferença significativa na indução da doença entre coelhos imunodeprimidos com corticosteróides e coelhos normais, sugerindo que o *P. insidiosum* poderia causar infecção mesmo em coelhos imunocompetentes (MILLER; CAMPBELL, 1983b).

A inoculação subcutânea de zoósporos nos coelhos resultou em supuração localizada progressiva; todavia, ulceração comparável com a que ocorre nos cavalos não foi reproduzida. Exames hematológicos revelaram uma progressiva leucocitose com neutrofilia moderada e discreta monocitose. Alterações similares na contagem de leucócitos foram observadas na infecção natural de cavalos (MILLER; CAMPBELL, 1983b). Portanto, essa espécie serve como modelo experimental para estudo sorológico e avaliação de imunoterapia (SANTURIO *et al.*, 2006a).

2.4 Tratamento

O tratamento de infecções causadas pelo *P. insidiosum* em animais e humanos é complicado pelas características singulares do agente. O *P. insidiosum* difere dos fungos verdadeiros na produção de zoósporos móveis e na composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto o *Pythium* contém celulose e β -glucanas. A membrana plasmática não

contém esteróides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Com isso, as drogas antifúngicas são ineficientes e a maioria dos animais atingidos não sobrevive em decorrência da infecção.

Três métodos terapêuticos são freqüentemente utilizados para o tratamento da pitiose: cirurgia, quimioterapia e imunoterapia (MENDOZA; AJELLO; McGINNIS, 1996). O sucesso das diferentes formas de tratamento é variável e em muitos casos o resultado é influenciado pelo tamanho, localização e duração da lesão. A excisão cirúrgica da lesão é o tratamento mais comum, entretanto, esta pode ser dificultada pelas estruturas anatômicas envolvidas, como, por exemplo, partes inferiores dos membros e face, nas quais estruturas vitais como nervos, vasos e tendões podem ser fatalmente envolvidos por excisões radicais. Nessas áreas, pode ser vantajoso remover-se o tecido granulomatoso em excesso, mas alguma forma de tratamento de manutenção deverá ser feito para que o fungo remanescente seja destruído. O tratamento de manutenção envolve drogas de uso tópico ou sistêmicas, porém, sabe-se que estas fornecem benefícios limitados ao tratamento da doença, especialmente pela penetração inadequada da droga em níveis terapêuticos dentro do granuloma (MILLER, 1981).

Em relação ao tratamento químico, várias tentativas foram realizadas utilizando drogas antifúngicas como anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol e compostos iodínicos obtendo-se resultados com baixos índices de melhoria e cura. GROOTERS relatou a cura clínica e sorológica de alguns cães com infecção por *P. insidiosum*, após terapia medicamentosa com drogas que causam segmentação do ergosterol. Aproximadamente 15% dos cães com pitiose gastrintestinal responderam ao itraconazol ou anfotericina B complexo lipídico. Em observações posteriores, o autor constatou melhoria clínica e sorológica ou resolução em vários casos de cães e gatos com pitiose cutânea tratados com uma combinação de itraconazol com terbinafina. Apesar de a percentagem de animais que respondem ao tratamento ainda seja baixa (menos de 20%), com base nas observações subjetivas do autor, o protocolo de combinação parece superior ao itraconazol ou anfotericina B utilizadas isoladamente (GROOTERS, 2003).

Em um estudo, no qual foi avaliada a utilização de anfotericina B para o tratamento de ficomicose subcutânea em cavalos, constatou-se uma eficiência de apenas 30% no tratamento somente com anfotericina B, 50% quando associa-se a

remoção cirúrgica da lesão com anfotericina B e 20% dos casos não responderam aos tratamentos utilizados (MC MULLAN *et al.*, 1977).

Os resultados obtidos com as drogas antifúngicas são controvertidos, tanto no tratamento clínico como nos testes de sensibilidade *in vitro* (SANTURIO *et al.*, 2006a). Em um estudo de SEKHON, PADHYE e GARG, no qual foi avaliada a sensibilidade *in vitro* de oito isolados de *P. insidiosum* frente aos poliênicos anfotericina B e hamycina, além de dois de seus análogos solúveis em água, e frente a flucitosina, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e miconazol, foi constatado que os poliênicos e seus análogos não apresentaram atividade satisfatória contra *P. insidiosum*, no entanto, os isolados mostraram-se sensíveis frente ao fluconazol, cetoconazol e miconazol, sendo que o miconazol realizou a mais intensa inibição, seguido pelo cetoconazol (SEKHON; PADHYE; GARG, 1992). Em outro trabalho, no qual SHENEP *et al.* avaliaram a sensibilidade do isolado de uma lesão periorbital de um menino de dois anos de idade com pitiose, frente a anfotericina B, flucitosina, miconazol e griseofulvina, foi observado que estes não inibiram o crescimento do fungo, porém, quando o isolado foi testado frente ao itraconazol, foi observada atividade moderada. Nesse mesmo estudo, pode-se constatar a efetividade da terbinafina frente ao *P. insidiosum*, e ainda o efeito sinérgico da associação entre terbinafina e itraconazol, os quais foram utilizados com sucesso no tratamento da criança (SHENEP *et al.*, 1998). TRISCOTT, WEEDON e CABANA descreveram o sucesso da anfotericina B no tratamento de dois casos de infecção periorbital em humanos, contrariando os resultados obtidos nos testes *in vitro* (TRISCOTT; WEEDON; CABANA, 1993).

A caspofungina, um antifúngico da classe das equinocandinas, tem o potencial de ser uma droga muito mais eficaz para o tratamento de oomicoses, em função da grande quantidade de β -glucanas presentes na parede celular do oomiceto e de seu mecanismo de ação, o qual consiste em bloquear a síntese de $\beta(1,3)$ -D-glucana da parede celular do fungo, através da inibição não competitiva da enzima $\beta(1,3)$ -D-glucana sintase (GROOTERS, 2003; PEREIRA *et al.*, 2007). Apesar desses fatores, PEREIRA *et al.*, através de um estudo no qual avaliaram a atividade *in vitro* e *in vivo* da caspofungina frente à cepas brasileiras de *P. insidiosum*, constataram que este é pouco suscetível a caspofungina, em função das elevadas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) obtidas. A baixa suscetibilidade do oomiceto à droga também foi observada no ensaio *in vivo*. Os resultados indicaram

que a atividade da caspofungina contra o *P. insidiosum* foi apenas fungistática (PEREIRA *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por ARGENTA *et al.*, com o objetivo de avaliar a atividade *in vitro* da terbinafina combinada com itraconazol e da terbinafina combinada com voriconazol frente a 30 isolados de *P. insidiosum* de animais com pitiose, demonstrou que as duas combinações apresentaram um efeito sinérgico contra apenas 17% dos isolados e foram indiferentes contra 83% dos isolados (ARGENTA *et al.*, 2008). Posteriormente, CAVALHEIRO *et al.* investigaram a atividade *in vitro* da terbinafina combinada com caspofungina, miconazol, cetoconazol e fluconazol contra 17 cepas de *P. insidiosum* isoladas de animais. Foram demonstrados efeitos sinérgicos com as combinações de terbinafina com fluconazol e terbinafina com caspofungina contra 41,2% das cepas de *P. insidiosum*. Efeitos sinérgicos também foram observados com combinações de terbinafina com cetoconazol e terbinafina com miconazol, porém, contra uma porcentagem ainda menor de cepas (29,4% e 11,8% das cepas, respectivamente) (CAVALHEIRO *et al.*, 2009).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* já foram realizados para avaliar a ação de diversas drogas antifúngicas contra diferentes cepas de *P. insidiosum*, sendo que quase a totalidade deles forneceu resultados pouco significativos em relação à efetiva ação destas drogas contra o agente da pitiose. Em razão disso, é possível afirmar que a ressecção cirúrgica total do granuloma combinada com imunoterapia específica para *P. insidiosum* é o tratamento mais indicado para cura clínica da pitiose em eqüinos (HUBERT; GROOTERS, 2002).

2.5 Imunoterapia

A imunoterapia, com base nos cavalos infectados que recebem a injeção de antígenos extraídos de *P. insidiosum*, tem sido utilizada com sucesso por mais de 20 anos no tratamento de eqüinos com pitiose (HUBERT; GROOTERS, 2002). A vacinação de eqüinos com produtos derivados de culturas de *P. insidiosum* demonstrou uma impressionante propriedade curativa em animais tratados na Austrália (MILLER, 1981) e na Costa Rica (MENDOZA; ALFARO, 1986).

MILLER foi o pioneiro no desenvolvimento de um imunoterápico, composto pelo micélio inativado e sonicado do próprio agente, o qual demonstrou ser eficaz na resolução da infecção em aproximadamente 53% dos animais tratados. As taxas de cura foram ainda maiores quando a vacinação foi utilizada em conjunto com o debridamento cirúrgico. Nos cavalos que responderam favoravelmente à vacina, os sinais de melhora (por exemplo, diminuição do exsudato e prurido e estabilização do tamanho da lesão) foram notados primeiramente entre 5 e 10 dias após a primeira das três ou mais aplicações semanais. Epitelização, fechamento dos “sinus” e redução da inflamação e tamanho da lesão foram observados entre 14 e 28 dias após o início da imunoterapia. Os efeitos secundários associados com esta vacina incluíram a produção de uma grave reação tecidual local, com a lesão tornando-se dolorosa e edemaciada, e o desenvolvimento de abscessos estéreis no local da aplicação (MILLER, 1981).

No decorrer da década de 80 e 90 vários autores utilizaram a imunoterapia, cada um com modificações na técnica originalmente descrita (SANTURIO *et al.*, 2006a). Ao longo dos últimos 25 anos, foram testados vários imunoterápicos, basicamente divididos em dois tipos: 1) utilizando a massa micelial para preparação do extrato antigênico e 2) utilizando o sobrenadante de culturas como antígeno.

Uma vacina de *P. insidiosum*, desenvolvida por MENDOZA e ALFARO, era composta de antígenos obtidos do sobrenadante das culturas. A vacina induziu a recuperação de três eqüinos entre os cinco tratados. Nesse estudo, a idade da lesão foi um importante fator quanto à previsão de resposta à imunoterapia, com taxas de cura de 100% em cavalos com lesões presentes há 15 dias ou menos, mas não havendo cura em cavalos com lesões presentes há mais de dois meses (MENDOZA; ALFARO, 1986).

MENDOZA *et al.* (1992a), compararam duas vacinas para tratamento da pitiose eqüina em 71 cavalos infectados. Uma vacina utilizou massa celular como antígeno e a outra utilizou um antígeno solúvel concentrado. As duas vacinas apresentaram resultado positivo em cavalos com lesões com menos de dois meses, com 60% e 70% de eficiência, respectivamente. No Brasil, MONTEIRO descreveu a eficácia de um imunoterápico (PITIUM-VAC[®]) produzido a partir de hifas maceradas de *P. insidiosum*, obtendo um índice de cura entre 50% e 83,3% para casos crônicos e casos recentes de pitiose eqüina, respectivamente (MONTEIRO, 1999). Posteriormente, foi desenvolvido um modelo experimental de pitiose em coelhos, o

qual avaliou três tipos de imunoterápicos, demonstrando que a preparação a partir da maceração do micélio obteve os melhores resultados, com 71% de redução das lesões experimentais (SANTURIO *et al.*, 2003).

Após o insucesso com tratamentos a base de anfotericina B, iodetos, cetoconazol e cirurgia, o uso de um imunoterápico, contendo antígenos secretados, bem como antígenos miceliais solúveis, em um menino talassêmico de 14 anos de idade, infectado pelo *P. insidiosum*, induziu a cura após duas aplicações (100µl) do imunoterápico, com intervalo de 14 dias (THITITHANYANONT, 1998). Há pouco tempo, as propriedades terapêuticas de uma “formulação melhorada” de um imunoterápico de *P. insidiosum*, foram avaliadas em 18 cavalos e seis cães com pitiose. A partir da nova formulação foi obtida 72% de cura dos eqüinos e 33% dos cães com pitiose. Cães com doença crônica (superior a dois meses) não responderam à imunoterapia (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003). WACHIWANAWIN *et al.*, em 2004, relataram que quatro de oito pacientes tailandeses com pitiose arterial terminal alcançaram a cura utilizando essa formulação, a qual contém os dois tipos de antígenos.

Na Tailândia, a maioria dos médicos utiliza a imunoterapia como abordagem curativa como um último recurso em casos de pitiose arterial humana. Como mencionado anteriormente, somente os coelhos são suscetíveis a pitiose experimental. Assim, a maioria das informações sobre imunoterapia foram obtidas a partir de hospedeiros naturalmente infectados e tratados. Embora essas observações, inicialmente, possam parecer uma desvantagem, elas podem ser mais seguras que os dados coletados em um modelo animal. Assim, os dados coletados em ensaios clínicos nos últimos 10 anos indicam que: 1) a imunoterapia é segura, tanto em humanos quanto em animais, 2) apresenta cura em aproximadamente 60% dos hospedeiros tratados, e 3) parece modular a resposta imune dos hospedeiros tratados (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Recentemente, a utilização do imunoterápico na pitiose bovina demonstrou eficácia de aproximadamente 100%. Ao contrário dos resultados obtidos em eqüinos e bovinos, a imunoterapia em cães e gatos tem sido desapontadora. Somente 33% dos cães, como citado anteriormente, e nenhum dos gatos tratados responderam ao tratamento. A causa real do fracasso é desconhecida, porém, a explicação mais plausível seria o fato de que a maioria dos cães e gatos com pitiose é diagnosticada vários meses após a fase inicial da infecção, resultando em animais com sistemas

imunitários enfraquecidos, os quais respondem muito mal a imunoterapia (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Apesar dos estudos sobre a doença e a imunoterapia, ainda não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção por *P. insidiosum*, em parte pelas diferenças entre o *P. insidiosum* e os fungos patogênicos para os mamíferos (SANTURIO *et al.*, 2006a). De acordo com MILLER, sabe-se que a maioria dos animais infectados com *P. insidiosum* são imunocompetentes, mesmo assim as infecções são progressivas. Esse fato sugere uma resposta imunológica inadequada ou alguma forma de bloqueio desta resposta, impedindo o organismo do hospedeiro de combater a infecção. Esse autor acredita que mesmo as hifas sendo antigênicas elas não são plenamente reconhecidas devido à densa reação inflamatória no local da infecção. Essa reação inflamatória é composta principalmente de eosinófilos, os quais degranulam-se sobre as hifas, impedindo uma adequada estimulação imunogênica (MILLER, 1981).

Em um estudo realizado em 1996 (MENDOZA; AJELLO; McGINNIS), baseado em mudanças teciduais observadas durante a infecção, foi proposto um possível mecanismo de resposta imunológica na pitiose eqüina. De acordo com esse mecanismo, no início da infecção as hifas de *P. insidiosum* liberariam antígenos solúveis que estimulam a produção de IgE. Essas imunoglobulinas, por sua vez, ligariam-se a superfície das hifas ativando mastócitos, os quais liberariam seus fatores quimiotáxicos para atrair eosinófilos ao sítio da infecção. Os eosinófilos ligariam-se a porção Fc das IgE nas hifas e eventualmente degranulariam, protegendo a hifa do sistema imune do hospedeiro. Tal mecanismo seria semelhante ao relatado nas infecções parasitárias.

As explicações para cura induzida pela imunoterapia são apenas propostas, baseadas nas características clínicas, histopatológicas e sorológicas da infecção e seu tratamento. Acredita-se que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia baseiam-se principalmente na resposta celular. Esse fato é sustentado pelas alterações teciduais após início da imunoterapia, com mudança de inflamação eosinofílica inicial para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T ao final da resposta. É provável que os antígenos presentes no imunógeno induzam esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais (MENDOZA; AJELLO; McGINNIS, 1996). Entretanto, NEWTON e ROSS verificaram que o nível de anticorpos anti-*Pythium* aumenta em eqüinos doentes

submetidos à imunoterapia. De acordo com os autores, o aumento do nível de anticorpos auxiliaria na cura (NEWTON; ROSS, 1993).

No estudo realizado para avaliar as propriedades terapêuticas de uma “formulação melhorada” de um imunoterápico de *P. insidiosum*, foram realizadas biópsias em série, tomadas de eqüinos tratados com sucesso pela imunoterapia. Foi possível observar que os eosinófilos presentes na reação inflamatória inicial foram gradualmente substituídos por macrófagos mononucleares e linfócitos (possíveis Linfócitos T citotóxicos). Sete dias após a aplicação do imunoterápico, uma evidente reação mononuclear ocorreu em torno das hifas de *P. insidiosum*. Hifas degeneradas do agente foram observadas por sete dias, sendo que estas não puderam mais ser detectadas 15 dias após a primeira aplicação do imunoterápico. Curiosamente, a cura das lesões cutâneas foi sempre perceptível sete dias após a aplicação do imunoterápico, coincidindo com o desaparecimento das hifas dos tecidos. Os autores também relataram a presença de baixos títulos de IgE em cavalos curados após a imunoterapia. As mudanças nas respostas mediadas por células, antes e após a aplicação do imunoterápico nos eqüinos deste estudo e naqueles em que humanos foram curados pela vacina, sustentam a hipótese de imunomodulação em eqüinos curados (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

O *P. insidiosum* possui dois tipos distintos de antígenos, os quais parecem estimular os diferentes subgrupos de células T auxiliar (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003). Um desses antígenos é um exoantígeno expresso *in vivo*, o qual tem sido atribuído à estimulação de uma reação eosinofílica em tecidos infectados. A detecção de exoantígenos dentro dos “*kunkers*” eqüinos durante a infecção natural destes animais, com anticorpos fluorescentes, reforça esta tese (MENDOZA; KAUFMAN; STANDARD, 1987). O segundo tipo trata-se de um antígeno citoplasmático, ao qual são creditadas propriedades curativas (MILLER, 1981; MONTEIRO, 1999; SANTURIO *et al.*, 2003). Os exoantígenos, os quais são secretados pelas hifas, ficam retidos nos “*kunkers*”, de onde são liberados para os tecidos circundantes e, em seguida, apresentados para as células dendríticas locais. Estes exoantígenos são responsáveis pelo bloqueio da resposta imune, através de um subgrupo Th2, que por sua vez, é responsável pelas características clínicas da doença. Ao contrário dos exoantígenos, os antígenos citoplasmáticos parecem estimular o sistema imune do hospedeiro a desenvolver uma imunidade curativa a partir do desenvolvimento de uma resposta Th1 (MENDOZA; MANDY; GLASS,

2003). A valorização das propriedades curativas de imunoterápicos pela adição de antígenos citoplasmáticos reforça esta idéia (THITITHANYANONT, 1998; MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005).

Alguns estudos têm constatado que as mudanças nos perfis de citocinas podem modular as respostas imunes dos hospedeiros. Por exemplo, pacientes humanos com pitiose sempre exibiam interleucina 4 (IL4). Em contraste, a IL2 era mais proeminente nos humanos tratados com sucesso pela imunoterapia. Outro fator foi a presença de altos títulos de IgE em humanos com pitiose (DIXON *et al.*, 1998 apud MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003). Foram encontrados também altos títulos de IgE em eqüinos com pitiose. No entanto, os anticorpos IgE declinaram após três meses de sucesso da imunoterapia. Desde que a IL4, eosinófilos e IgE são comumente associados a uma resposta Th2, a sua presença antes da imunoterapia e subsequente desaparecimento após a vacinação bem-sucedida, sustenta o conceito de modulação imunológica (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

A partir destas mudanças observadas, foi proposta uma hipótese que explica a patogênese da pitiose, bem como os efeitos curativos dos imunoterápicos contra a pitiose. Quando os zoósporos móveis de *P. insidiosum* entram em contato com o hospedeiro, através de uma ferida aberta, estes zoósporos formam um tubo germinativo que penetra mecanicamente nos tecidos. Uma vez nos tecidos, as hifas de *P. insidiosum* liberam exoantígenos, os quais são apresentados às células apresentadoras de antígeno (APC). As APC liberam IL4, a qual estimula a atração de linfócitos T auxiliar (Th0) do subgrupo Th2, que por sua vez induzem a produção de mais IL4 e IL5. As IL4 reduzem a expressão de Th1 e estimulam as células B a produzir IgE, IgM e IgG, as quais são detectadas pela maioria dos testes de diagnóstico. As IL5 e IgE desencadeiam a mobilização de eosinófilos e mastócitos ao local da lesão. Essas células irão degranular (responsáveis pelos danos teciduais) sobre as hifas de *P. insidiosum* provocando o fenômeno de Splendore-Hoeppli, que mais tarde desenvolverá os “*kunkers*” (apenas na pitiose eqüina). *P. insidiosum* multiplica-se no interior dos “*kunkers*” onde produz grandes quantidades de exoantígenos, um evento que, em última instância, bloqueia a resposta imune mediada por células, devido a Th2. Quando os imunógenos da vacina são injetados em um hospedeiro com pitiose, os antígenos são apresentados às APC de uma forma diferente da que ocorre durante a infecção natural. As APC liberam intérferon

γ (IFN γ), o qual ativa Th0 para Th1. O Th1 produz mais IFN γ e também IL2. Por sua vez, IL2 e IFN γ desencadearão uma resposta imune mediada por células mononucleares (CMI), composta principalmente por linfócitos T citotóxicos e macrófagos, os quais irão danificar e destruir as hifas de *P. insidiosum*. Não está claro se, durante a imunoterapia, IL2 e IFN γ também estimulariam as células B para produção de classes de IgG protetoras. A produção de IFN γ no local da infecção pelas APC e Th1 resultará na redução da expressão de Th2. A ativação de Th1 e a redução da expressão de Th2 poderiam explicar a cura de cavalos, cães e humanos com pitiose após o tratamento com o imunoterápico (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

Acredita-se que o sistema imune do hospedeiro é enganado pelos exoantígenos de *P. insidiosum*. Em função de o sistema imune do hospedeiro sempre detectar os antígenos que este patógeno apresenta para as células dendríticas locais, o sistema imune está sempre produzindo mais eosinófilos e mastócitos. A produção da reação de Splendore-Hoeppli e a secreção de exoantígenos são prováveis estratégias evolucionárias desenvolvidas pelo agente para garantir a sua proliferação nos tecidos do hospedeiro. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que as hifas viáveis de *P. insidiosum* foram encontradas apenas dentro da reação eosinofílica ou no interior dos “*kunkers*” em infecções eqüinas, indicando que o *P. insidiosum* pode usar o fenômeno de Splendore-Hoeppli para sua sobrevivência, pois, desta forma, o patógeno não é completamente apresentado ao sistema imune do hospedeiro (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005).

2.6 Diagnóstico

Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose baseava-se nos aspectos clínicos, histopatológicos e no isolamento e identificação do agente através de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas. A identificação precoce da doença, no entanto, torna-se difícil através desses métodos. Atualmente, métodos como imunohistoquímica e técnicas sorológicas auxiliam e suportam um diagnóstico precoce e correto (SANTURIO *et al.*, 2006a).

O desenvolvimento de técnicas sorológicas para o diagnóstico e monitoramento da resposta imunológica em eqüinos com pitiose, demonstrou a importância desses métodos em função da grande precisão de alguns deles. MILLER e CAMPBELL desenvolveram as técnicas de imunodifusão em gel de ágar (ID), fixação de complemento (FC) e um teste de hipersensibilidade intradérmica (TI), para diagnosticar e avaliar a resposta imune humoral e celular de cavalos com pitiose. Os pesquisadores utilizaram três diferentes antígenos: um antígeno tripsinizado para ID, um antígeno resultante de sucessivos congelamentos e descongelamentos da cultura para FC, e um antígeno solúvel precipitado para o teste intradérmico. Os testes realizados em cavalos com pitiose clínica comprovada, diagnosticaram positivamente 100% (ID), 82% (FC) e 64% (TI) dos casos. Os cavalos aparentemente saudáveis que participaram do estudo, apresentaram resultados negativos no teste de ID. Também foi observado que as imunoglobulinas anti-*P. insidiosum* poderiam não ser detectadas pelo teste de ID em cavalos com pitiose tratados com sucesso por imunoterapia. Esses dados comprovaram que o teste de ID apresenta alta sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos anti *P. insidiosum* (MILLER; CAMPBELL, 1982b).

Em 1986, pesquisadores desenvolveram um antígeno ainda mais sensível para o teste de ID. Este novo antígeno detectou mais bandas de precipitação em soros de coelhos infectados experimentalmente, bem como, em soros de cavalos infectados (MENDOZA; KAUFMAN; STANDARD, 1986b). Em 1987, estes mesmos pesquisadores introduziram um ensaio que utilizava anticorpos fluorescentes específicos contra as hifas de *P. insidiosum*, permitindo a diferenciação entre as hifas do agente da pitiose e aquelas de outros fungos filamentosos, inclusive de outras espécies de *Pythium*, em tecidos infectados do hospedeiro. Também neste estudo, foi demonstrado que os isolados causadores de doença em eqüinos, caninos e humanos pertencem a uma única espécie, *P. insidiosum*, e que esta espécie é diferente das outras espécies de *Pythium* (MENDOZA; KAUFMAN; STANDARD, 1987). Uma estratégia similar foi usada um ano depois por BROWN *et al.*, os quais descreveram pela primeira vez um método imunohistoquímico para diagnóstico da pitiose eqüina. Eles desenvolveram um ensaio indireto baseado na reação de cortes histológicos, a partir de biópsias de cavalos, fixados em formalina, com anticorpo primário contra *P. insidiosum*, produzido em coelhos, e anticorpo secundário marcado com peroxidase (BROWN *et al.*, 1988b). Estes dois ensaios

contribuíram para a identificação das hifas de *P. insidiosum* em tecidos, especialmente quando a cultura do organismo não é possível.

A eficiência da ID para o soro-diagnóstico das zigomicoses causadas por *Basidiobolus ranarum* e *Conidiobolus coronatus* em humanos e animais, assim como para pitiose, foi demonstrada, o que comprovou que este teste é eficiente para o diagnóstico diferencial destas três micoses em humanos e animais (MENDOZA; KAUFMAN; STANDARD, 1990 apud SANTURIO *et al.*, 2006a).

Em função de um crescente acometimento de humanos e animais pela pitiose, foi desenvolvido e avaliado um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando um antígeno solúvel de hifas sonicadas de *P. insidiosum*. Neste estudo, foram utilizadas amostras de soro de humanos e animais com pitiose comprovada, as quais foram analisadas pelo teste de ID e pelo teste de ELISA, sendo que o teste de ID não detectou a doença em todos os soros analisados (61,5%), já o teste de ELISA apresentou resultados positivos com todas as amostras (100%). Os resultados indicaram que o teste de ELISA é um teste confiável para o diagnóstico sorológico da pitiose, apresentando especificidade semelhante à do teste de ID, porém, com maior sensibilidade (MENDOZA *et al.*, 1997). Posteriormente, outros pesquisadores também demonstraram a elevada especificidade e sensibilidade do teste de ELISA na detecção da pitiose em todos os hospedeiros infectados (KRAJAEJUN *et al.*, 2002; GROOTERS *et al.*, 2002a).

No Brasil, SANTURIO *et al.* padronizaram um teste ELISA para o diagnóstico sorológico da pitiose em eqüinos e coelhos, visando a diminuição de erros e de tempo necessário para o diagnóstico (SANTURIO *et al.* 2006b). Também no Brasil, foi desenvolvida uma técnica de “ELISA-conta” para detecção da soropositividade de eqüinos, apresentando bons resultados (ALVES *et al.*, 2001). O diagnóstico imunológico, pela técnica de ELISA, possibilita a detecção de infecções precoces ou ainda subclínicas (MENDOZA *et al.*, 1997), além de possibilitar a caracterização da resposta humoral a *P. insidiosum* durante a infecção.

Alguns pesquisadores descreveram um teste de hemaglutinação (HA) para o diagnóstico rápido da pitiose humana. Glóbulos vermelhos de ovinos foram revestidos com extrato protéico de *P. insidiosum* e utilizados em ensaios de detecção usando amostras de soro de pacientes com pitiose vascular, cutânea e ocular, além de amostras de soro de pacientes com outros tipos de doenças ou sem distúrbios conhecidos, usados como controle. Foram obtidos resultados positivos

com apenas duas amostras do grupo controle e com todos os pacientes com pitiose vascular e cutânea. Os resultados negativos foram obtidos com amostras de soro de todos os pacientes com pitiose ocular e com o restante das amostras de soro do grupo controle. Esses resultados demonstraram que o teste de HA possui uma sensibilidade de 88% e uma especificidade de 99%, provando que este teste é um método confiável para o diagnóstico sorológico de pitiose vascular e cutânea (JINDAYOK *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas para o diagnóstico da pitiose em humanos e animais. Uma delas é a técnica de western blot, a qual permite uma análise apurada da resposta imune humoral durante a pitiose. Alguns pesquisadores realizaram um estudo com o objetivo de investigar quais antígenos de *P. insidiosum* que poderiam desempenhar um importante papel na resposta imune de cavalos a este agente, e para tanto, eles utilizaram a técnica de western blot. Foram utilizadas cinco diferentes cepas de *P. insidiosum*, as quais foram cultivadas em caldo nutriente e posteriormente sonicadas e centrifugadas para a obtenção do sobrenadante, o qual foi utilizado como antígeno. O antígeno obtido foi submetido à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para análise do perfil antigênico das cinco cepas, as quais demonstraram perfis similares. Após esta análise, os antígenos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose para que se avaliasse a reação dos antígenos com o soro de cavalos com pitiose, cavalos que tiveram pitiose e estavam curados por vacinação há um ano e cavalos saudáveis. O western blot revelou que os soros de cavalos com pitiose reagiram com no mínimo 20 proteínas com pesos moleculares entre 14 e 68 kDa em todas as cepas. Porém, apenas três proteínas, com pesos moleculares de 32, 30 e 28 kDa, pareceram ser imunodominantes e específicas, pois destacaram-se das demais. Os soros dos animais curados pela imunoterapia apresentaram somente cinco bandas fracas, sendo que três delas eram de 32, 30 e 28 kDa. De acordo com os autores, esse fato demonstra a provável importância desses antígenos na imunidade à doença. Não foi observada nenhuma banda com o soro dos animais saudáveis ou com alguma outra infecção (MENDOZA; NICHOLSON; PRESCOTT, 1992b).

LEAL *et al.* realizaram a caracterização da especificidade da resposta humoral a antígenos de *P. insidiosum*, utilizando o soro de eqüinos e bovinos naturalmente infectados, e o soro de coelhos imunizados com antígenos de *P.*

insidiosum. O soro dos cavalos e coelhos reagiu com cinco proteínas principais, enquanto o soro dos bovinos apresentou quatro bandas imunodominantes, sendo duas diferentes das detectadas com o soro de eqüinos e coelhos. Essa observação associada à cura espontânea das lesões sugere que as proteínas imunodominantes em bovinos podem ser antígenos com potencial vacinal (LEAL *et al.*, 2005).

Estudos recentes têm utilizado a técnica de western blot para o diagnóstico da pitiose e para o estudo do perfil antigênico de isolados. Em um estudo utilizando quatro isolados, sendo dois deles recuperados a partir de biópsias de tecidos de pacientes talassêmicos, o terceiro de biópsia de tecido de um paciente leucêmico e o quarto a partir de uma úlcera córnea, foi aplicada a técnica de Western blot no diagnóstico de pitiose, utilizando amostras de soro de um paciente talassêmico. Foram observadas, no western blot, bandas reativas com proteínas de peso molecular de 110, 73, 56, 42 a 35, 30 a 28, 26, e 23 kDa. Os pesquisadores deste estudo, acreditam que as bandas de forte intensidade observadas com as proteínas de 30 a 28 kDa nesse estudo, poderiam ser as mesmas bandas observadas no estudo de MENDOZA, NICHOLSON e PRESCOTT, em 1992. Foram observadas também alta reatividade com as proteínas de 42 e 35 kDa (VANITTANAKOM *et al.*, 2004).

Um grupo de pesquisadores realizou um estudo com o objetivo de avaliar o uso de western blot para o diagnóstico da pitiose humana, identificando determinados antígenos do *P. insidiosum* e aumentando o entendimento sobre a resposta imune humoral contra o patógeno. Para tanto, eles utilizaram 16 isolados de *P. insidiosum* e 12 amostras de soro de pacientes com pitiose que viviam em diferentes áreas geográficas da Tailândia. A partir deste estudo, foi identificada uma proteína proeminente de 74 kDa em todos os isolados de *P. insidiosum* sondados com todas as 12 amostras de soro (KRAJAEJUN *et al.*, 2006), fato que os instigou a analisar esta proteína de forma mais aprofundada. Posteriormente, utilizando uma abordagem proteômica para caracterização, a proteína de 74 kDa foi identificada como uma suposta exo-1,3- β glucanase. A análise molecular genética mostrou que essa proteína é codificada por um gene cuja seqüência é homóloga à de um gene de uma exo-1,3- β glucanase (EXO1) de *Phytophthora infestans*, o qual é um membro oomiceto de um gênero estreitamente relacionado ao *Pythium*. As glucanases são um interessante grupo de enzimas hidrolíticas que estão presentes em muitos organismos, e, embora supostas glucanases tenham sido identificadas

em muitos oomicetos, sabe-se pouco sobre seu papel biológico e patológico. Buscando evidências adicionais da imunoreatividade da glucanase de 74 kDa, estes pesquisadores desenvolveram um teste ELISA utilizando os peptídeos sintéticos s74-1 e s74-2, os quais representam porções desta glucanase, e observaram que estes peptídeos foram fortemente reconhecidos pelos soros com pitiose, mas não pelos soros controle, demonstrando que estes peptídeos poderiam ser utilizados como novos alvos antigênicos para o desenvolvimento de testes sorológicos de diagnóstico (KRAJAEJUN *et al.*, 2010).

Recentemente, foi realizado um estudo utilizando uma metodologia padronizada para a realização de western blot, com o objetivo de avaliar o perfil protéico e imunogênico de cepas de *P. insidiosum*, geograficamente divergentes, provenientes de países da América e da Ásia. As diferentes cepas foram sondadas com amostras de soro de bovinos, cães, gatos, cavalos e humanos com pitiose, provenientes também de países da América e da Ásia. Os perfis protéicos das diferentes cepas, analisados a partir de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) corado, mostraram padrões semelhantes entre os isolados geograficamente diferentes. A partir do western blot, foi possível observar que os anticorpos presentes nos soros reconheceram uma ampla variedade de proteínas imunogênicas únicas de *P. insidiosum*. Embora algumas das proteínas de destaque neste estudo tenham sido relatadas previamente, várias outras ainda têm de ser descritas, como o antígeno de massa molecular de aproximadamente 28 kDa, o qual foi detectado pelos anticorpos em todas as amostras de soro avaliadas, no entanto, este antígeno foi fortemente expresso por apenas uma das cepas avaliadas. Também uma proteína difusa de aproximadamente 51 kDa, a qual não foi detectada pelos anticorpos no soro humano, mas foi reconhecida pelos anticorpos no soro de bovinos, gatos, cães e cavalos, sendo que este antígeno foi expresso por apenas duas das cepas investigadas. A variação do perfil protéico de *P. insidiosum*, observada neste estudo, revelado por anticorpos nos soros de diferentes espécies, indica que algumas cepas geograficamente divergentes de *P. insidiosum* expressam alguns imunógenos exclusivos *in vitro* e que, durante a infecção natural (*in vivo*), podem expressar um número maior de antígenos variavelmente detectados por indivíduos da mesma espécie, mas, especialmente, através das espécies (CHINDAMPORN *et al.*, 2009).

O seqüenciamento gênico com amplificação do RNA ribossomal, região ITS 1, através de PCR (reação em cadeia da polimerase) é uma ferramenta poderosa para detecção de *P. insidiosum*, como foi demonstrado por um estudo realizado por GROOTERS e GEE, no qual o ensaio apresentou alta especificidade na identificação do patógeno (GROOTERS; GEE, 2002b). SCHURKO *et al.* realizaram a análise filogenética de 23 isolados de *P. insidiosum* de todo o mundo, através da análise das seqüências das regiões ITS. Os autores demonstraram que todos os isolados eram mais estreitamente relacionados entre si do que com outras espécies de *Pythium*. As diferenças observadas nas seqüências das regiões ITS, permitiram a divisão dos isolados de *P. insidiosum* em três grupos filogeneticamente distintos, de acordo com a distribuição geográfica: grupo I, consistindo nos isolados das Américas, grupo II, consistindo nos isolados da Ásia e Austrália, e grupo III, consistindo nos isolados da Tailândia e dos Estados Unidos. Curiosamente, o grupo III parecia ser o mais distinto dos três grupos, o que pode indicar que este grupo representa uma subespécie distinta (SCHURKO *et al.*, 2003).

Os antígenos predominantes, reconhecidos por western blot, podem ser úteis no desenvolvimento de uma ferramenta diagnóstica mais sensível e específica para a pitiose, permitindo um diagnóstico precoce e a aplicação de um tratamento eficaz, fatores cruciais para um melhor prognóstico para as diversas espécies acometidas pela doença. Também podem ser utilizados como um guia para uma maior compreensão das características imunológicas desta infecção. Os antígenos de *P. insidiosum* detectados por soros de hospedeiros infectados poderiam ser utilizados como antígenos purificados na imunoterapia da doença.

3 OBJETIVOS

3. 1 Objetivo geral:

Caracterização protéica e imunológica de isolados de *P. insidiosum* utilizando-se soros de cavalos e coelhos infectados e tratados, e de bovinos infectados naturalmente.

3. 2 Objetivos específicos

- Caracterizar e comparar o perfil protéico dos extratos de *Pythium insidiosum* (*P. insidiosum* ATCC 58637 e *P. insidiosum* 210-LAPEMI) pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- Identificar mudanças no perfil de reconhecimento dos extratos de *P. insidiosum* pelos soros dos animais tratados após a imunoterapia;
- Comparar a resposta humoral (IgG) de eqüinos infectados e tratados com o imunoterápico contra pitiose eqüina com a resposta desenvolvida por coelhos infectados experimentalmente e tratados com imunoterapia e com a de bovinos infectados e curados espontaneamente, através de western blot, frente aos extratos de *P. insidiosum*;
- Identificar os antígenos imunodominantes de *P. insidiosum* através de western blot, sondado com soro de eqüinos e coelhos infectados e tratados com imunoterapia;
- Identificar os antígenos imunodominantes de *P. insidiosum*, através de western blot, sondado com soro de bovinos infectados naturalmente pelo *P. insidiosum* e curados naturalmente;
- Relacionar as proteínas imunodominantes nas diferentes espécies e identificar os antígenos com potencial vacinal.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Caracterização de antígenos imunodominantes de *Pythium insidiosum* reconhecidos por anticorpos de eqüinos, coelhos e bovinos

Patrícia Bernardes Cavalheiro^I, Valéria Maria Lara^{II}, Régis Zanette^{III}, Camila Mahl^{IV},
Mario de La Rue^{II}, Janio Moraes Santurio^{II}, Sydney Hartz Alves^{II}

A ser submetido à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Caracterização de antígenos imunodominantes de *Pythium insidiosum* reconhecidos por anticorpos de eqüinos, coelhos e bovinos

Patrícia Bernardes Cavalheiro^I, Valéria Maria Lara^{II}, Régis Zanette^{III}, Camila Mahl^{IV},
Mario de La Rue^{II}, Janio Moraes Santurio^{II}, Sydney Hartz Alves^{II}

^ICurso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

^{II}Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

^{III}Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

^{IV}Curso de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

Endereço para correspondência:

Sydney Hartz Alves

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Departamento de Microbiologia e Parasitologia

Laboratório de Pesquisas Micológicas - LAPEMI

Avenida Roraima, Prédio 20, sala 4139

CEP 97105-900, Santa Maria, RS

Fone/Fax: 55 3220-8906

E-mail: hartzsa@smail.ufsm.br

RESUMO

O oomiceto *Pythium insidiosum* é o agente etiológico da pitiose, doença granulomatosa crônica que afeta animais domésticos (eqüinos, bovinos, etc) e o homem, em regiões tropicais e subtropicais de todo mundo. A ausência de ergosterol na membrana plasmática deste microorganismo torna a antifungioterapia muito limitada, donde a imunoterapia (a base de hifas rompidas) tem emergido com resultados promissores. A identificação de antígenos imunodominantes é fundamental para a consolidação dos imunoterápicos utilizados no tratamento da pitiose. Objetivando-se o refinamento destes imunoterápicos, o presente estudo teve como proposta inicial, caracterizar os antígenos imunodominantes desta espécie (*P. insidiosum* ATCC 58637 e *P. insidiosum* 210-LAPEMI) através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Diversas proteínas de 120 a 15 kDa foram detectadas e, a seguir, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose para realização de western blot. O segundo objetivo foi caracterizar a resposta humoral à doença em eqüinos, bovinos e na infecção experimental em coelhos, considerando-se a doença curada pela imunoterapia, doença tratada pela imunoterapia e não curada, doença não tratada, e na doença evidenciando cura espontânea. Para tanto, utilizou-se o soro de: a) eqüinos doentes e curados pela imunoterapia; b) eqüinos doentes e sem resposta a imunoterapia; c) eqüinos doentes e não tratados; d) bovinos doentes e com cura espontânea; e) coelhos infectados e tratados pela imunoterapia; f) coelhos infectados e não tratados. Todos os soros reconheceram três proteínas imunodominantes: 74, 33 e 32 kDa. O soro dos eqüinos doentes curados pela imunoterapia (a) e o soro dos bovinos (d) reconheceram também outra proteína imunodominante de 55 kDa, a qual, foi fracamente reconhecida ou ausente nos demais grupos. Assim, comprova-se que as proteínas de 74, 33 e 32 kDa desempenham relevante papel na resposta imune à pitiose, pois foram imunogênicas nas três espécies avaliadas. Em adição, sugere-se que a proteína de 55 kDa possa estar envolvida no mecanismo de cura promovido pela imunoterapia; ressalta-se que esta proteína é aqui pela primeira vez relatada.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*; imunoterapia; proteínas imunodominantes.

ABSTRACT

Oomycete *Pythium insidiosum* is the etiologic agent of pythiosis, chronic and granulomatous disease, which affects humans and animals in tropical and subtropical areas of the world. Due to ergosterol absence in the plasmatic membrane of this microorganism, treatments based on antifungal agents have been ineffective. Immunotherapy has emerged showing promising results. In this context, the improvement of the immunotherapy was the main goal of this study, whose first purpose was to characterize the immunodominant antigens from this species (*P. insidiosum* ATCC 58637 and *P. insidiosum* 210-LAPEMI) through sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Some proteins showing 15 kDa to 120 kDa were detected, and bands were transferred to nitrocellulose membranes in order to develop the western blot tests. The second purpose was to characterize the humoral response to pythiosis in equine, in bovine and in experimental pythiosis in rabbits, considering the no treated disease, the disease cured by immunotherapy, the disease treated with immunotherapy but not cured, and the disease cured spontaneously. To encompass all these cases we have included sera from: a) horses cured by immunotherapy; b) horses with pythiosis but not responsive to immunotherapy; c) horses with pythiosis but not treated; d) bovines with pythiosis and showing spontaneous cure; e) rabbits with experimental pythiosis but not treated; and f) rabbits with experimental pythiosis treated with immunotherapy. All specimens recognized three immunodominant proteins: 74, 33 and 32 kDa. The sera from horses cured by immunotherapy (a) and bovine sera (d) recognized another immunodominant protein, 55 kDa, which was weakly positive or negative in the other groups. Thus, the 74, 33 and 32 kDa immunodominant proteins suggest a relevant function in the humoral response to pythiosis because they were recognized by horses, rabbits and bovines. In addition, the 55 kDa antigen, which is being reported here for the first time, is likely to be involved in the cure mechanisms stimulated by immunotherapy.

Keywords: *Pythium insidiosum*; immunotherapy; immunodominant proteins

INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático, classificado no reino *Stramenopila*, filo *Oomycota*, família *Pythiaceae*, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum*. Esse gênero apresenta mais de 120 espécies, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas¹. Apenas a espécie *P. insidiosum* é patogênico para mamíferos, sendo assim o agente etiológico da pitiose^{2, 3}. A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa do tecido subcutâneo que acomete várias espécies animais, porém a doença é mais frequentemente observada em eqüinos, podendo, também, afetar o homem⁴. A presença de massas necróticas semelhantes a corais, denominadas “*kunkers*”, é uma característica da enfermidade nos eqüinos^{5, 6}.

O tratamento da pitiose em animais e humanos é complicado devido à ausência de ergosterol na membrana plasmática do oomiceto^{2, 7}. Em função do ergosterol constituir-se no principal alvo de ação da maioria dos antifúngicos, estes fármacos tornam-se ineficientes para o tratamento da enfermidade. Em consequência desta limitação, MILLER⁸ propôs a imunoterapia com base na utilização de antígenos derivados do próprio agente. Posteriormente, a imunoterapia também foi utilizada no tratamento de cães^{9, 10} e humanos^{11, 12}. Nas décadas de 80 e 90, vários autores utilizaram a imunoterapia no tratamento da pitiose eqüina e obtiveram índices de cura variados^{13, 14, 15}. Recentemente, a maioria dos relatos sobre imunoterapia apresenta índices de cura entre 40 e 80%^{16, 17}. Até o momento, ainda não foram descritos casos de infecção natural por *P. insidiosum* em coelhos, porém, está bem demonstrado que os coelhos são suscetíveis à infecção experimental¹⁸ e que a resposta à imunoterapia pode ser facilmente monitorada utilizando-se estes animais como modelo experimental¹⁹.

A infecção por *P. insidiosum* induz a produção de anticorpos específicos, os quais podem ser detectados pelos testes de imunodifusão^{20, 21}, ELISA^{22, 23, 24, 25} e western blot^{26, 27, 28, 29, 30, 31}, sendo que este último permite uma análise acurada da resposta imune humoral durante a pitiose. Nos últimos anos, alguns estudos foram realizados com intuito de avaliar a resposta imunológica e identificar os antígenos imunodominantes de cepas de *P. insidiosum* isoladas de várias espécies de animais^{26, 28-31}. Recentemente, utilizando espectrometria de massa, foi identificada e caracterizada a primeira proteína imunodominante de *P. insidiosum* isolado de um paciente humano, uma glucanase³¹. O conhecimento da resposta imune e dos antígenos imunodominantes é de grande relevância, pois permitirá, principalmente, a melhor eficácia do tratamento com o imunoterápico, bem como no diagnóstico da enfermidade. Neste contexto, este estudo foi objetivado a: a) avaliar diferenças no perfil protéico de dois isolados de *P. insidiosum*; b) detectar variações antigênicas entre estes isolados; c) caracterizar a resposta humoral pré e pós-tratamento entre eqüinos, coelhos e bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas de *Pythium insidiosum*

Para caracterização protéica e imunológica do *P. insidiosum* foram utilizados dois isolados: uma cepa de referência *P. insidiosum* ATCC 58637 (isolado padrão dos EUA) e uma cepa de campo *P. insidiosum* 210-LAPEMI isolada de um eqüino doente oriundo da Cidade de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, a qual foi identificada

molecularmente pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) no Laboratório de Pesquisas Micológicas/LAPEMI - Universidade Federal de Santa Maria/UFSM.

Preparação dos antígenos

A produção do extrato protéico total do *P. insidiosum* baseou-se na metodologia descrita por KRAJAEJUN *et al.*²⁹, com algumas modificações. Resumidamente, os isolados de *P. insidiosum* eram cultivados em frascos contendo 150 mL de caldo Sabouraud, incubados sob agitação constante (150 rpm) a 37°C durante sete dias. Após a incubação, a cultura era inativada com 0,02% de timerosal e filtrada. O micélio coletado era lavado com água ultra-pura estéril e congelado para ser submetido à liofilização até a obtenção de um pó com baixo teor de umidade (três a quatro dias). O liofilizado recebeu três banhos consecutivos de nitrogênio líquido e em cada banho foi macerado com auxílio de um pistilo, sendo todo o processo realizado sob gelo. O pó obtido foi ressuscitado em tampão de extração (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM Iodoacetamida, 1 mM PMSF, 1 mM TPCK). Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 g por 20 min a 8°C e o sobrenadante, chamado de extrato miceliano solúvel, foi coletado e usado como antígeno. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (595 nm), usando albumina bovina como padrão. Os extratos micelianos foram divididos em pequenas alíquotas e armazenados a -70°C.

Amostras de Soro:

Eqüinos: os eqüinos foram divididos em três grupos experimentais: Grupo I- sete cavalos infectados naturalmente e curados após a imunoterapia, sendo coletada uma amostra antes da imunização (dia zero) e uma amostra após a quinta (5ª) dose do imunoterápico (PITIUM-VAC®) de cada animal, totalizando 14 amostras (a aplicação do imunoterápico foi realizada com intervalo de duas semanas entre as doses); Grupo II- sete cavalos infectados naturalmente e sem apresentar remissão ao tratamento, sendo coletada uma amostra antes da imunização (dia zero) e uma amostra após a quinta dose do imunoterápico de cada animal, totalizando 14 amostras; e Grupo III- seis cavalos infectados naturalmente, utilizados como controle positivo. Uma amostra de soro fetal eqüino foi utilizada como controle negativo. O diagnóstico da pitiose foi realizado por isolamento do agente e por ELISA.

Coelhos: 12 coelhos foram infectados experimentalmente, por via subcutânea, e submetidos ao tratamento com o imunoterápico sonicado. A inoculação experimental foi realizada de acordo com SANTURIO *et al.*¹⁹. Cada coelho recebeu três doses do imunoterápico com intervalo de 14 dias entre as injeções (dias 0, 14 e 28), sendo que os soros foram coletados nos dias 0 (soro pré-imune) e 42, totalizando 24 amostras. A imunoterapia iniciou um mês após a inoculação com zoósporos móveis viáveis. Também foram utilizados soros de três coelhos infectados experimentalmente e sem tratamento (grupo controle positivo), e o soro de um coelho sadio, como controle negativo.

Bovinos: foram utilizadas amostras de soro de três bovinos com pitiose confirmada por ELISA. Os bovinos foram clinicamente avaliados durante três meses

e, apesar de nenhum tratamento, os mesmos apresentaram cura espontânea das lesões³². Uma amostra de soro fetal bovino foi utilizada como controle negativo.

SDS-PAGE

Os extratos protéicos do *P. insidiosum* foram analisados em SDS-PAGE, previamente descrito por LEAL *et al.*²⁸, com pequenas modificações. Em resumo, aproximadamente 20µg dos extratos micelianos solúveis (antígeno) foram misturados ao tampão de corrida (loading buffer) (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% Sodium Dodecyl Sulfate [SDS], 25% glicerol, 14.4 mM mercaptoethanol, 0.01% Bromophenol Blue, Bio-Rad, Hercules, CA). Após homogeneização, as amostras foram submetidas a tratamento térmico (100°C) durante 5 min. A separação protéica foi realizada a 100 V em gel de poliacrilamida (12%) em condição desnaturante (minigel apparatus/ Bio-Rad, Hercules, CA). Para análise do perfil protéico, os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250. Para estabelecer comparações utilizou-se um marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards/Bio-Rad, Hercules, CA).

Western blot

Para realização do western blot, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Medium-Pure nitrocellulose membrane [0,45 µm], Bio-Rad, Hercules, CA) por uma hora a 100 V. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (10X blocking buffer, Sigma-Aldrich®, MO) sob agitação, durante uma hora à temperatura ambiente, e

mantidas em repouso “overnight” no tampão de bloqueio a 4°C. Após esse período, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 0,05% Tween 20, pH 7.6) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente com os diferentes soros dos animais diluídos em tampão de bloqueio (Sigma-Aldrich®, MO), os soros de eqüinos e de coelhos foram diluídos a 1:3000, enquanto que os soros bovinos foram diluídos a 1:1000. Após esta etapa, as membranas foram novamente lavadas (três vezes) para retirada dos anticorpos primários não ligados e incubadas à temperatura ambiente com anticorpo secundário (anti-IgG espécie-específico [eqüino, bovino ou de coelho], conjugado com fosfatase alcalina, Sigma-Aldrich®, MO) diluído 1: 15.000 em tampão de bloqueio (Sigma-Aldrich®, MO) por uma hora, e submetidos a mais três lavagens com PBS-T por 15 minutos cada. Após um novo ciclo de lavagem, adicionou-se tampão de fosfatase alcalina (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) para regulação do pH, o qual agiu durante 10 min., com posterior revelação. A revelação foi realizada com solução de BCIP/NBT (0.48 mM Nitro Blue Tetrazolium [NBT], 0.56 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate [BCIP], 10 mM Tris-HCl, pH 9.2, e 59.3 mM MgCl₂, Sigma-Aldrich®, MO). A interrupção da reação ocorreu pela imersão das membranas em água destilada. As membranas coradas foram posteriormente fotografadas.

RESULTADOS

Os perfis protéicos dos extratos micelianos solúveis das cepas de *P. insidiosum* ATCC 58637 e da cepa isolada a campo *P. insidiosum* 210-LAPEMI encontram-se na figura 1. Na análise dos perfis protéicos podem ser observadas

várias bandas com peso molecular aproximado entre 120 a 15 kDa, das quais pelo menos 14 bandas fortes foram evidenciadas. A comparação entre os dois isolados estudados evidenciou perfil protéico muito similar.

As proteínas eletrotransferidas da cepa *P. insidiosum* ATCC 58637 e da cepa isolada a campo *P. insidiosum* 210-LAPEMI foram incubadas com 14 soros dos eqüinos do grupo I (animais tratados e curados) (figura 2). Os anticorpos (IgG) presentes reagiram com várias proteínas de ambas as cepas de *P. insidiosum*, com peso molecular aproximado entre 100 a 32 kDa. As frações antigênicas que reagiram fortemente e que podem ser consideradas imunodominantes foram as de ~74, ~55, ~33 e ~32 kDa para ambas as cepas. Entretanto, a banda de ~55 kDa apresentou diferença de intensidade entre as amostras utilizadas para sondar as membranas contendo proteínas da cepa de campo *P. insidiosum* 210-LAPEMI. Além disso, não foi observada nenhuma diferença entre as amostras coletadas no momento zero e pós-imunização (cinco doses), a não ser pela intensidade das bandas pós-imunização.

Os resultados com os soros dos eqüinos do grupo II estão apresentados na figura 3. Os eqüinos deste grupo não apresentaram cura após o tratamento com o imunoterápico. A comparação dos resultados obtidos dos grupos I e II permitiu observar: 1) em ambos os grupos, os soros reagiram contra sete proteínas de mesmo peso molecular (~100 a ~32 kDa); 2) a banda de ~55 kDa foi identificada em ambos os grupos e apresentou diferença de intensidade entre eles, sendo que nos eqüinos curados (grupo I) a intensidade desta banda foi de moderada a intensa, enquanto para o grupo II foi bastante fraca e; 3) para ambos os grupos, as bandas imunodominantes foram as de ~74, ~33 e ~32 kDa tanto nos soros pré-imunização, como os coletados após a imunização.

O grupo III, formado por eqüinos infectados naturalmente e sem tratamento, foram utilizados como controle positivo. Os soros desses animais reconheceram nove proteínas com peso molecular entre 100 a 32 kDa. Os soros dos animais positivos reconheceram as mesmas proteínas dos animais do grupo II frente às duas cepas estudadas. Similarmente aos grupos I e II, as bandas imunodominantes foram as de ~74, ~33 e ~32 kDa.

Vinte e oito amostras de soros de coelhos foram utilizadas neste experimento: 24 de animais infectados experimentalmente e tratados com imunoterápico (PITIUM-VAC[®]); três soros de animais infectados experimentalmente e não tratados (controle positivo) e o soro de um coelho sadio (controle negativo). Os soros dos coelhos reagiram diferentemente frente às duas cepas estudadas. Além disso, foram observadas diferenças de reconhecimento antigênico entre os soros dos animais. Nesse contexto, os soros dos coelhos reagiram contra oito diferentes proteínas da cepa de campo *P. insidiosum* 210-LAPEMI com pesos moleculares entre 100 a 32 kDa (figura 4). Frente a cepa *P. insidiosum* ATCC 58637 foram identificadas 12 proteínas com peso molecular entre 250 a 32 kDa (figura 5). Entretanto, a banda de ~250 kDa foi identificada somente nos soros dos animais tratados. Cabe ressaltar que os soros utilizados como controle positivo reagiram com as mesmas proteínas do grupo tratado frente às duas cepas de *P. insidiosum*, com diferenças de intensidade entre os soros. Para ambas as cepas de *P. insidiosum*, as bandas imunodominantes foram as mesmas identificadas pelos anticorpos dos eqüinos (~74, ~33 e ~32 kDa). O controle negativo e os soros coletados no dia zero não reconheceram nenhuma proteína.

A figura 6 apresenta os resultados obtidos no western blot realizado com os soros de bovinos. A análise dessas membranas mostrou diferenças entre as cepas

de *P. insidiosum* estudadas, sendo observada nitidamente reação contra seis proteínas da cepa de *P. insidiosum* ATCC 58637 e contra oito proteínas da cepa de campo *P. insidiosum* 210-LAPEMI com peso molecular variando entre ~110 a 32 kDa. As proteínas comuns a ambas as cepas de *P. insidiosum* foram as de ~110, ~74, ~70, ~55, ~33 e ~32 kDa, sendo que as proteínas consideradas imunodominantes (de maior intensidade), para ambas as cepas, foram as proteínas de 74, 55, 33 e 32 kDa. Além disso, foram observadas diferenças de intensidade das bandas entre as amostras dos soros e nenhuma reação foi evidenciada no soro fetal bovino.

Um resumo das proteínas imunodominantes detectadas pelos soros dos diferentes grupos e espécies pode ser observado na tabela 1.

DISCUSSÃO

O perfil protéico de ambas as cepas de *P. insidiosum* estudadas apresentou um padrão semelhante. Essa similaridade de perfil protéico entre cepas de *P. insidiosum* de diferentes regiões geográficas já foi relatada em outro estudo³⁰. Nesse contexto, o perfil protéico das cepas *P. insidiosum* ATCC 58637 e de campo *P. insidiosum* 210-LAPEMI foram similares ao encontrado em isolados de *P. insidiosum* oriundos da Tailândia³⁰.

O padrão de reatividade dos soros dos eqüinos, avaliados no presente estudo, contra os antígenos de *P. insidiosum* foi similar entre as cepas utilizadas. Nos três grupos, os anticorpos reagiram contra várias proteínas com peso molecular de ~100 a 32 kDa. Entretanto, apenas três bandas imunodominantes (~74, 33 e 32 kDa) foram comuns aos três grupos. Os soros dos eqüinos do grupo I (animais

tratados e curados) reagiram contra uma proteína de ~55 kDa de ambas as cepas. Esta reação também foi observada com os soros dos outros dois grupos, porém, não com a mesma intensidade, havendo falha no seu reconhecimento por alguns soros; não foi possível comparar esse achado com nenhum estudo publicado. A literatura dispõe de somente três estudos utilizando soros de eqüinos^{26, 28, 30}, e destes, apenas dois utilizaram soros de cavalos imunizados; a referida proteína de ~55 kDa não foi identificada em nenhum dos trabalhos. Por outro lado, CHINDAMPORN *et al.*³⁰ identificaram um antígeno imunodominante de ~51 kDa em isolados de *P. insidiosum* oriundos das Américas. Como os pesos moleculares destes antígenos são muito próximos, novos estudos deverão ser realizados com intuito de identificá-los e caracterizá-los.

O perfil de reatividade dos soros de coelhos com os antígenos do *P. insidiosum* apresentou-se similar ao obtido pela sondagem com os soros dos eqüinos. Esses achados reforçam os resultados citados por outros trabalhos, os quais afirmam que os coelhos podem ser utilizados como modelo experimental para pitiose animal, uma vez que a resposta imune humoral dos coelhos é semelhante à de outras espécies naturalmente suscetíveis ao *P. insidiosum*^{19, 28}. Entretanto, com as diferenças de reconhecimento imunogênico entre as cepas observadas no presente trabalho, sugere-se que os estudos de resposta imune devem ser realizados com cepas locais de *P. insidiosum*. Inclusive, resultados semelhantes foram apresentados em outro trabalho³⁰, em que diferenças imunogênicas foram observadas entre cepas geograficamente distintas de *P. insidiosum*, reforçando essa sugestão.

Os anticorpos dos soros dos bovinos e dos coelhos estudados também reconheceram a proteína de ~55 kDa; contudo, entre os coelhos imunizados e os

bovinos, a intensidade da banda variou de fraca a moderada. Vale ressaltar que os bovinos investigados apresentaram cura espontânea da pitiose, o que pode sugerir a importância do reconhecimento dessa proteína no desenvolvimento da cura da doença. Nova análise utilizando outras metodologias, como as técnicas de imunoproteômica e ELISA, poderão investigar a relevância dessa proteína sobre a resposta imunológica ao *P. insidiosum*.

Apesar das variações no perfil de reconhecimento antigênico das cepas de *P. insidiosum* entre os soros das espécies animais investigadas, três antígenos principais (~74, ~33 e ~32 kDa) foram detectados pelos anticorpos de eqüinos, coelhos e bovinos. Esses resultados confirmam a importância desses antígenos na resposta imunológica à doença, uma vez que as bandas de ~74 e ~32 kDa já foram identificadas como imunodominantes em outros estudos^{26, 29-31}. Contudo, deve-se destacar a relevância do antígeno de ~74 kDa, o qual foi recentemente caracterizado como uma exo-1,3- β glucanase³¹. Essa proteína foi obtida do macerado miceliano de uma cepa de *P. insidiosum*, tal como neste estudo, o que sugere que ambas as proteínas sejam idênticas. O reconhecimento da proteína de ~74 kDa por anticorpos humanos e das três espécies estudadas demonstra a importância deste antígeno na resposta imune à pitiose. A interespecificidade dessa proteína a torna candidata a ser utilizada em testes diagnósticos. KRAJAEJUN *et al.*³¹ padronizaram uma reação ELISA utilizando peptídeos sintéticos oriundos desta proteína (74 kDa), onde tais peptídeos foram reconhecidos somente pelos soros de pacientes com pitiose.

Finalmente, os resultados do presente estudo evidenciaram a importância de três proteínas imunodominantes de ~74, ~33 e ~32 kDa relacionadas a resposta imune à pitiose. O reconhecimento adicional da proteína de ~55 kDa pelo soro de eqüinos curados pela imunoterapia e dos bovinos com cura espontânea destaca a

relevância desta proteína na resposta imune frente à infecção pelo *P. insidiosum*. Todavia, novas pesquisas utilizando diferentes metodologias devem ser realizadas para confirmar estes achados.

AGRADECIMENTOS

Ao Setor de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela disponibilização dos equipamentos. Às colegas Sonia Botton, Maria Isabel de Azevedo e Régis Zanette pelo auxílio na identificação e cultivo das cepas de *P. insidiosum*. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela liberação de recursos financeiros, nº do processo (474055/2007-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

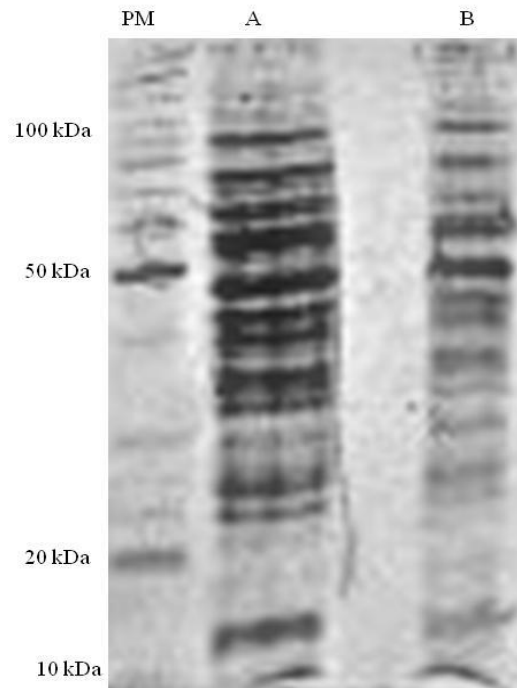
1. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Phylum Oomycota. *In: Introductory Mycology*, 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996. p. 683-737.
2. Foil CS. Update on Pythiosis (Oomycosis). *The North American Veterinary Conference 1996*; 23: 57-63.
3. Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Médicale* 1996; 6: 151-164.
4. Santurio JM, Alves SH, Pereira DB, Argenta JS. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34: 1-14.
5. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31: 2967-2973.
6. Chaffin MK, Schumacher J, McMullan WC. Cutaneous pythiosis in the horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1995; 11: 91-103.
7. Grooters AM. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *The Veterinary clinics of North America: Small animal practice* 2003; 33: 695-720.
8. Miller RI. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. *Australian Veterinary Journal* 1981; 57: 377-382.

9. Hensel P, Greene CE, Medleau L, Latimer KS, Mendoza L. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2003; 223: 215-218.
10. Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine* 2003; 21: 2797-2804.
11. Thitithanyanont A, Mendoza L, Chuansumrit A, Pracharktam R, Laothamatas J, Sathapatayavongs B *et al.* Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 27: 1394-1400.
12. Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A *et al.* Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine* 2004; 22: 3613-3621.
13. Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. *Mycopathologia* 1986; 94: 123-129.
14. Mendoza L, Villalobos J, Calleja CE, Solis A. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosum in horses. *Mycopathologia* 1992; 119: 89-95.

15. Monteiro AB. Imunoterapia da pitiose eqüina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria 1999; 52p.
16. Leal AT, Leal ABM, Flores EF, Santurio JM. Pitiose. *Ciência Rural* 2001; 31: 735-743.
17. Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Medical mycology* 2005; 43: 477-486.
18. Miller RI, Campbell RSF. Experimental pythiosis in rabbits. *Sabouraudia* 1983; 21: 331-341.
19. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Festugatto R, Lubeck I, Sallis ESV *et al.* Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosi developed and evaluated. *Vaccine* 2003; 21: 2535-2540.
20. Miller RI, Campbell RSF. Immunological studies on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal* 1982; 58: 227-231.
21. Mendoza L, Kaufman L, Standard PG. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. *Journal of Clinical Microbiology* 1986; 23: 813-816.

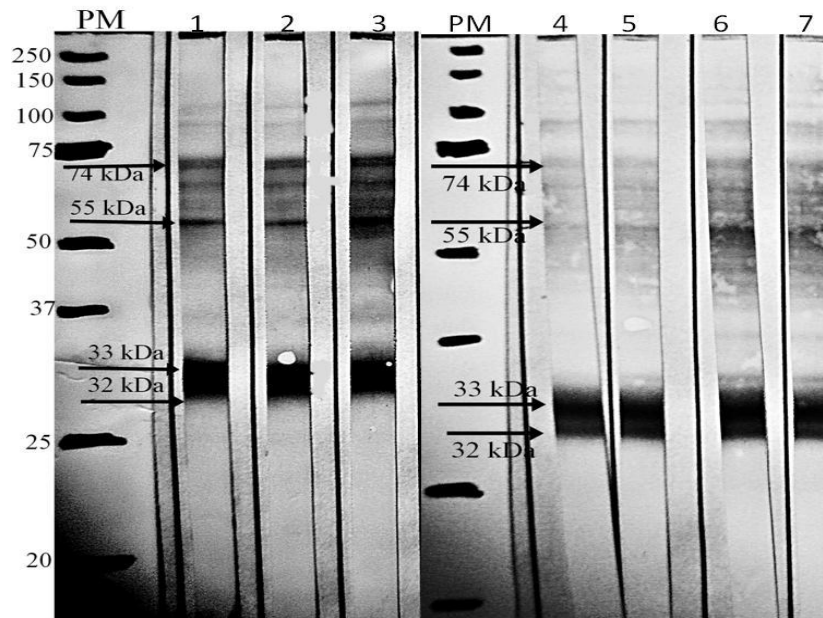
22. Mendoza L, Kaufman L, Mandy W, Glass R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1997; 4: 715-718.
23. Krajaejun T, Kunakorn M, Niemhom S, Chongtrakool P, Prachartam R. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9: 378-382.
24. Grooters AM, Leise BS, Lopez MK, Gee MK, O'Reilly KL. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16: 142-146.
25. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Alves SH, Lubeck I, Griebeler J *et al.* Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2006; 26: 47-50.
26. Mendoza L, Nicholson V, Prescott JF. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30: 2980-2983.
27. Vanittanakom N, Supabandhu J, Khamwan C, Preparattanapan J, Thirach S, Prasertwitayakij N *et al.* Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 3970-3974.

28. Leal AT, Santurio JM, Leal ABM, Catto JB, Flores EF, Lubeck *et al.* Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum* antigens. *Journal de Mycologie Médicale* 2005; 15: 63-68.
29. Krajaejun T, Kunakorn M, Prachartam R, Chongtrakool P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A *et al.* Identification of a novel 74-Kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 1674-1680.
30. Chindamporn A, Vilela R, Hoag KA, Mendoza L. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16: 330-336.
31. Krajaejun T, Keeratijarut A, Sriwanichrak K, Lownnoo T, Rujirawat T, Petchthong T *et al.* 74-kiloDalton immunodominant antigen of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* is a putative exo-1,3- β glucanase. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010 (*in advance*).
32. Santurio JM, Monteiro AB, Leal AT, Kommers GD, Sousa RS, Catto JB. Cutaneous pythiosis insidiososi in calves from the pantanal region of Brazil. *Mycopathologia* 1998; 141: 123-125.

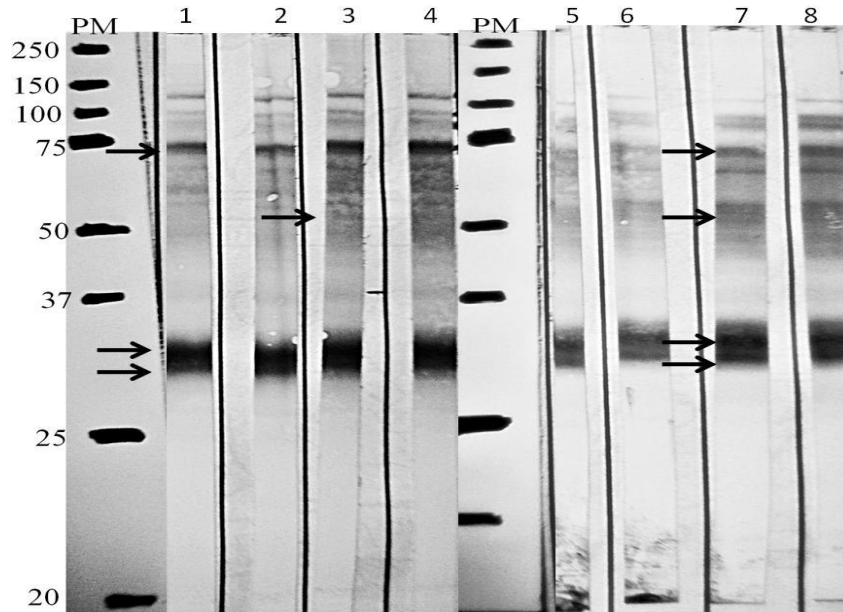
FIGURAS E TABELA**Figura 1**

Análise eletroforética de extratos protéicos de cepas de *Pythium insidiosum* em gel de poliacrilamida corado com azul brilhante de coomassie. PM- Marcador de peso molecular; A- cepa padrão de *P. insidiosum* ATCC 58637; B- *P. insidiosum* 210-LAPEMI.

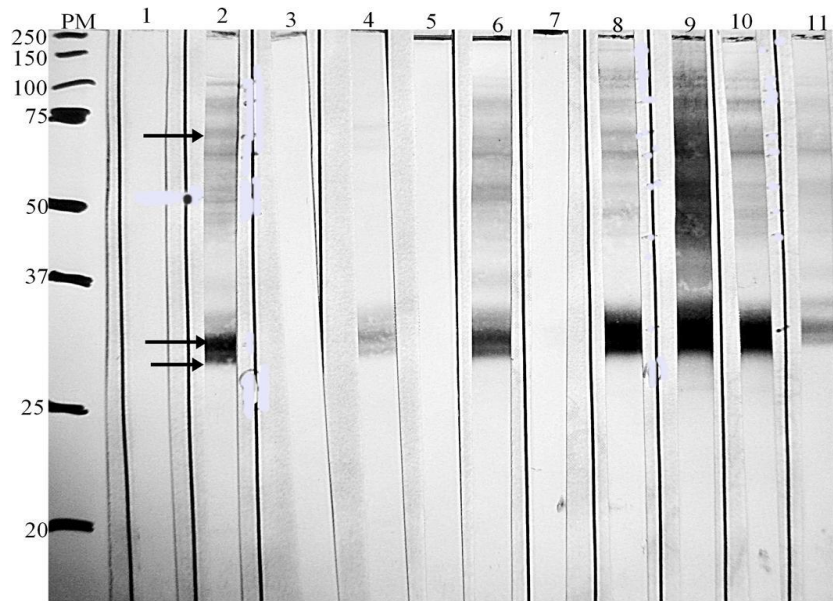
Figura 2



Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* sondados com soros de equinos curados pós-imunoterapia. Colunas 1, 2 e 3: proteínas imunodominantes da cepa padrão de *P. insidiosum* ATCC 58637; Colunas 4, 5, 6 e 7: proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* 210-LAPEMI; PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes para ambas as cepas de *P. insidiosum* analisadas.

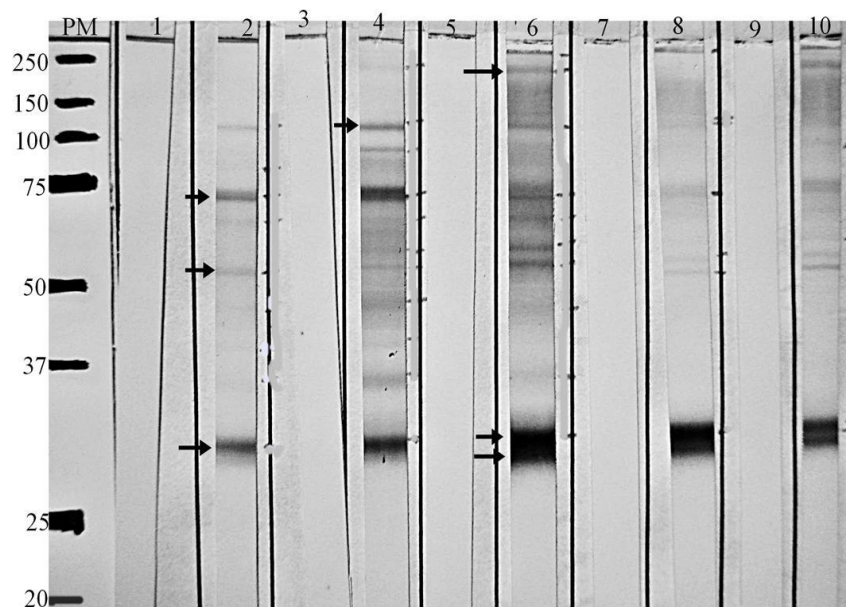
Figura 3

Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* sondados com soros de equinos que não desenvolveram cura pós-imunoterapia. Colunas 1, 2, 3 e 4: proteínas imunodominantes da cepa padrão de *P. insidiosum* ATCC 58637; Colunas 5, 6, 7 e 8: proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* 210-LAPEMI; PM-marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes para ambas as cepas de *P. insidiosum* analisadas.

Figura 4

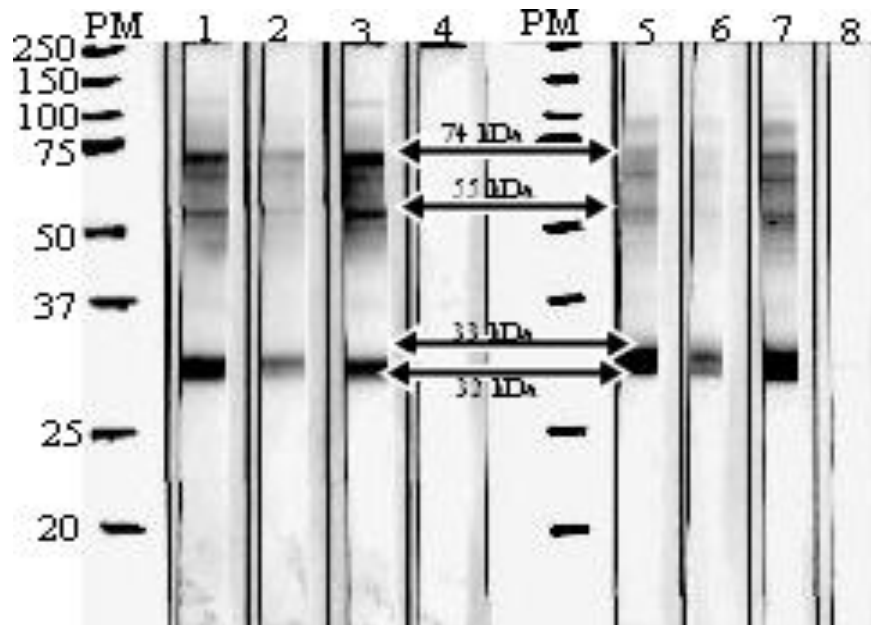
Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* 210-LAPEMI sondados com soros de coelhos tratados e sem tratamento. Colunas 1, 3, 5 e 7: sondagem da membrana com soros de animais pré-imunoterapia; Colunas 2, 4, 6 e 8: sondagem da membrana com soros de animais pós-imunoterapia; Colunas 9, 10 e 11: sondagem da membrana com soros de animais inoculados experimentalmente com zoósporos de *P. insidiosum* e sem imunização (controle positivo); PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes de aproximadamente 74, 33 e 32 kDa.

Figura 5



Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* ATCC 58637 (cepa padrão) sondados com soros de coelhos pré-imunoterapia e tratados. Colunas 1, 3, 5, 7 e 9: sondagem da membrana com soros de animais pré-imunoterapia; Colunas 2, 4, 6, 8 e 10: sondagem da membrana com soros de animais pós-imunoterapia; PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes de aproximadamente 250, 110, 74, 55, 33 e 32 kDa.

Figura 6



Perfil de imunoreatividade de antígenos de *P. insidiosum* sondados com soros de bovinos. Colunas 1, 2 e 3: proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* ATCC 58637; Colunas 5, 6 e 7: proteínas imunodominantes de *P. insidiosum* 210-LAPEMI (cepa de campo); Colunas 4 e 8: controles negativos; PM- marcador de peso molecular (kDa). As setas indicam as principais proteínas imunodominantes para ambas as cepas de *P. insidiosum* analisadas: 74, 55, 33 e 32 kDa.

Tabela 1

Proteínas imunodominantes reconhecidas pelos anticorpos de eqüinos, coelhos e bovinos com pitiose pré e pós-imunoterapia.

Espécies	Grupos experimentais	Proteínas imunodominantes
Eqüinos	Grupo I (n= 14): animais tratados e curados	74, 55 , 33 e 32 kDa
	Grupo II (n= 14): animais tratados e não curados	74, 33 e 32 kDa
	Grupo III (n= 6): animais com pitiose sem tratamento (controle positivo)	74, 33 e 32 kDa
Coelhos	Animais inoculados experimentalmente (dia zero) (n= 12)	Nenhuma banda de reação foi observada
	Animais doentes e tratados (dia 42) (n= 12)	74, 33 e 32 kDa
	Animais doentes sem tratamento (n= 3)	74, 33 e 32 kDa
Bovinos	Animais doentes com cura espontânea (n= 3)	74, 55 , 33 e 32 kDa

5 DISCUSSÃO

Os perfis das proteínas das duas cepas analisadas (*P. insidiosum* ATCC 58637 e *P. insidiosum* 210-LAPEMI), separadas no gel de SDS-poliacrilamida 12% e posteriormente corados com azul brilhante de Coomassie, apresentaram diversas bandas de proteínas com massa molecular variando de 15 a 120 kDa. A comparação dos perfis antigênicos das duas cepas revelou que elas possuem o mesmo padrão de migração. Posteriormente, estas proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose para então reagirem com soros de diferentes espécies naturalmente ou experimentalmente infectadas com *P. insidiosum*. Estas reações revelaram o perfil de imunógenos expressados *in vivo* bem como as variações entre os perfis de reconhecimento dessas proteínas pelas espécies avaliadas e, ainda, as possíveis alterações desencadeadas pela imunoterapia.

O padrão de reatividade dos soros dos eqüinos avaliados no presente estudo frente aos antígenos de *P. insidiosum* foi similar entre as cepas utilizadas, com algumas variações entre os diferentes grupos de soros testados. Nos três grupos de soros, as bandas de reatividade localizaram-se entre as massas moleculares de 110 a 32 kDa. Três bandas imunodominantes de 74, 33 e 32 kDa foram comumente observadas com os três grupos de soros, porém, os soros pertencentes ao grupo I (eqüinos tratados e curados) desenvolveram uma banda imunodominante adicional de ~55 kDa com ambas as cepas, a qual também foi observada com os soros dos outros dois grupos, entretanto, não de forma imunodominante, apresentando-se com fraca intensidade. Os soros dos grupos II e III (eqüinos tratados e não curados e animais infectados sem tratamento, respectivamente) apresentaram o mesmo perfil de reatividade contra as proteínas das cepas utilizadas. A banda imunodominante de ~55 kDa necessita de nova e mais refinada avaliação pois, além de não haver relatos prévios sobre sua detecção, esta proteína foi imunodominante quando reagiu com os soros dos animais curados pela imunoterapia; sugere-se que o reconhecimento deste antígeno possa estar relacionado, de alguma maneira, a resposta ao imunoterápico.

A reatividade dos soros de coelhos com os antígenos analisados apresentou variações entre as duas diferentes cepas; entretanto, foi muito similar entre os dois grupos avaliados (coelhos tratados e não tratados). Os antígenos de ambas as cepas ao serem sondados com os soros dos dois grupos revelaram como antígenos imunodominantes as proteínas de 74, 33 e 32 kDa, as quais também foram reconhecidas como imunodominantes por todos os soros dos três grupos de eqüinos do estudo. A banda imunodominante de ~55 kDa, detectada pelos soros dos eqüinos que desenvolveram a cura da doença após imunoterapia, também foi detectada pelos soros dos coelhos, porém, como banda de fraca intensidade. Além dessas bandas imunodominantes mais importantes, os soros dos coelhos de ambos os grupos (tratados/não tratados) também reconheceram bandas de menor intensidade reconhecidas por todos os soros dos cavalos avaliados, com pequenas variações. Estas observações demonstram que os perfis de reatividade dos soros de coelhos e dos soros de eqüinos com antígenos de *P. insidiosum* são muito semelhantes, indicando o acerto na utilização de coelhos como modelo experimental para pitiose. Este modelo tem sido utilizado para avaliação de aspectos da resposta imunológica à imunoterapia, como previamente demonstrado por SANTURIO *et al.* (2003), além de ressaltar a importância desses antígenos durante a infecção.

Os soros dos bovinos analisados no presente estudo são oriundos de animais que evidenciaram a cura da doença sem intervenção de qualquer tratamento. Os anticorpos presentes nos soros dos bovinos evidenciaram o reconhecimento dos antígenos com variações frente às duas cepas de *P. insidiosum*. Os soros dos bovinos desenvolveram bandas imunodominantes contra as mesmas proteínas de 74, 33 e 32 kDa de ambas as cepas; as mesmas também foram detectadas com os soros dos eqüinos e coelhos. Adicionalmente detectou-se uma banda de 55 kDa com reação de intensidade moderada; esta banda apresentou-se como uma das bandas imunodominantes somente com os soros dos eqüinos do grupo I (tratados e curados), sendo fracamente reconhecida pelos soros dos demais eqüinos e coelhos. Os casos de pitiose em bovinos são raros, fato que restringe o número de estudos sobre a resposta imunológica desenvolvida por esta espécie ao *P. insidiosum* (LEAL *et al.*, 2005; CHINDAMPORN *et al.*, 2009) tornando difícil a correlação entre os resultados obtidos.

Alguns estudos sobre a resposta imune humoral desencadeada pelo *P. insidiosum* em eqüinos, utilizando a técnica de western blot como método de

sondagem das proteínas imunogênicas, já foram realizados (MENDOZA; NICHOLSON; PRESCOTT, 1992b; LEAL *et al.*, 2005; CHINDAMPORN *et al.*, 2009), porém, apenas um destes estudos relatou a utilização de soros de cavalos que desenvolveram a cura após tratamento com imunoterápico. No presente estudo, foi observado o desenvolvimento de uma forte reação contra uma proteína de ~55 kDa, em ambas as cepas utilizadas, somente com os soros dos eqüinos pertencentes ao grupo dos animais que curaram-se após imunoterapia, ao passo que todos os soros dos demais eqüinos e coelhos do estudo desenvolveram uma fraca reação contra essa proteína. Os soros dos bovinos com pitiose curada sem tratamento, também reagiram contra esta proteína, entretanto, de forma menos intensa que os soros dos eqüinos curados através da imunoterapia. A forte reação contra essa proteína observada somente com os soros dos eqüinos curados e a reação mais moderada observada com os soros dos bovinos indica que esta proteína de 55 kDa influencia no desenvolvimento da cura da doença, requerendo uma avaliação mais aprofundada.

Recentemente, utilizando espectrometria de massa, a proteína de 74 kDa, a qual havia sido identificada previamente como proteína imunodominante na pitiose em humanos (KRAJAEJUN *et al.*, 2006), foi caracterizada como uma glucanase (KRAJAEJUN *et al.*, 2010). Esta proteína, juntamente com as proteínas de 33 e 32 kDa, foi identificada em ambas as cepas e com todos os soros das três espécies analisadas em nosso trabalho, demonstrando a alta imunogenicidade dessa proteína não só em humanos, mas também nas espécies aqui avaliadas.

Apesar de algumas variações no perfil de reconhecimento dos antígenos do *P. insidiosum* entre os soros das espécies avaliadas, três antígenos principais foram comumente detectados por cavalos, coelhos e bovinos, nas duas cepas utilizadas: 74, 33 e 32 kDa, além de uma proteína adicional de 55 kDa, a qual foi reconhecida de forma mais intensa pelos cavalos curados após imunoterapia e de forma mais moderada pelos bovinos, os quais desenvolveram cura espontânea. Este fato indica a importância da influência exercida por estas proteínas sobre a resposta ao *P. insidiosum*, especialmente do antígeno de 55 kDa, e a necessidade de caracterização destes antígenos, como já realizado com a proteína de 74 kDa (KRAJAEJUN *et al.*, 2010). A identificação de antígenos imunodominantes com potencial vacinal é fundamental para o aprimoramento da imunoterapia. A partir deste estudo, sugerimos que o enriquecimento da vacina existente com os

antígenos imunodominantes aqui detectados, merece uma investigação mais aprofundada.

A utilização de um imunoterápico com antígenos conhecidos poderá aumentar os índices de cura e possibilitará a avaliação do papel desempenhado por estes antígenos no controle preventivo da pitiose. Além disso, o reconhecimento destas proteínas imunodominantes e sua futura caracterização também poderia contribuir para o desenvolvimento de um método que permita o diagnóstico precoce e seguro da pitiose, o qual seria de grande importância para a aplicação do tratamento adequado, levando a um prognóstico mais favorável. Em função de algumas variações nos métodos usados para a produção dos antígenos, a detecção de proteínas comparáveis por western blot entre os estudos existentes pode não ocorrer, apontando para a necessidade de padronização destes métodos para uma melhor caracterização destes antígenos (CHINDAMPORN *et al.*, 2009).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação, podemos inferir que:

- Os perfis protéicos das cepas analisadas (*P. insidiosum* ATCC 58637 e *P. insidiosum* 210-LAPEMI) evidenciaram os mesmos padrões de migração.
- Três proteínas imunodominantes de aproximadamente 74, 33 e 32 kDa das cepas de *P. insidiosum* ATCC 58637 e *P. insidiosum* 210-LAPEMI foram reconhecidas, de forma comum, pelos soros de eqüinos, coelhos e bovinos.
- Somente os soros dos eqüinos do grupo I (animais curados após a imunoterapia) e dos bovinos (evidenciaram cura espontânea) reconheceram, de forma imunodominante, uma proteína adicional de aproximadamente 55 kDa presente em ambas as cepas.
- O reconhecimento das mesmas proteínas imunodominantes (74, 33 e 32 kDa) pelos soros dos animais das três espécies avaliadas indica a importância destas proteínas na resposta imune humoral ao *P. insidiosum*.
- O reconhecimento da proteína de 55 kDa como uma das proteínas imunodominantes, somente pelos soros dos eqüinos que evoluíram para a cura após imunoterapia e dos bovinos, os quais apresentaram cura espontânea, sugere que a mesma possa estar envolvida no desenvolvimento da cura da pitiose, requerendo, pois, mais criteriosa caracterização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ALVES, S. H.; BOETTCHER, C. S.; LEAL, A. T.; LEAL, A. M.; SILVA, J. E. P.; SANTURIO, J. M. Aplicação do “ELISA-conta” no diagnóstico da pitiose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, p. 155-157, 2001.

ARGENTA, J. S.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; PEREIRA, D. I. B.; CAVALHEIRO, A. S.; SPANAMBERG, A.; FERREIRO, L. *In vitro* activities of Voriconazole, Itraconazole, and Terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* Isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 767-769, 2008.

BISSONNETTE, K. W.; SHARP, N. J. H.; DYKSTRA, M. H.; ROBERTSON, I. R.; DAVIS, B.; PADHYE, A. A.; KAUFMAN, L. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 29, n. 1, p. 39-44, 1991.

BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; ARAÚJO, J. P. Jr.; CANDEIAS, J. M. G.; FRANDO, M. F.; MARQUES, M. E. A.; MENDOZA, L.; CAMARGO, R. P.; MARQUES, S. A. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.

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

BROWN, C. C.; McCLURE, J.J.; TRICHE, P.; CROWDER, C. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 11, p. 1866-1868, 1988b.

CARVALHO, E. C. Q.; ROSA, C. A. R.; CRUZ, C. H. *et al.* *Hyphomyces destruens*: agente da "ferida brava" (Hifomicose) em eqüinos do Pantanal de MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XIX, 1984, Cuiabá. **Anais...** Cuiába, 1984. p. 311.

CAVALHEIRO, A. S.; MABONI, G.; AZEVEDO, M. I.; ARGENTA, J. S.; PEREIRA, D. I. B.; SPADER, T. B.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. *In vitro* activity of Terbinafine combined with Caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2136-2138, 2009.

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

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

CHANDLER, F. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. A color atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases. **Year Book Medical Publishers, Inc.**, Chicago, 1980. p. 104-105.

CHINDAMPORN, A.; VILELA, R.; HOAG, K. A.; MENDOZA, L. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 3, p. 330-336, 2009.

DE COCK, A.W.; MENDOZA, L.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.

FISCHER, J. R.; PACE, L. W.; TURK, J. R.; KREEGER, J. M.; MILLER, M. A.; GOSSER, H. S. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 3, p. 380-382, 1994.

FOIL, C. S. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**, v. 23, p. 57-63, 1996.

GABRIEL, A. L.; KOMMERS, G. D.; TROST, M. E.; BARROS, C. S. L.; PEREIRA, D. B.; SCHWENDLER, S. E.; SANTURIO, J. M. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 583-587, 2008.

GOAD, M. E. Pulmonary pythiosis in a horse. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 2, p. 261-262, 1984.

GRECCO, F. B.; SCHILD, A. L.; QUEVEDO, P.; ASSIS-BRASIL, N. D.; KOMMERS, G. D.; PEREIRA, C. M.; SOARES, M. P. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 938-942, 2009.

GROOTERS, A. M.; LEISE, B. S.; LOPEZ, M. K.; GEE, M. K.; O'REILLY, K. L. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n. 2, p. 142-146, 2002a.

GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n. 2, p. 147-152, 2002b.

GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary clinics of North America: Small animal practice**, v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.

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

HUBERT, J. D.; GROOTERS, A. 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, n. 826, p. 558-560, 1994.

JINDAYOK, T.; PIROMSONTIKORN, S.; SRIMUANG, S.; KHUPULSUP, K.; KRAJAEJUN, T. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 7, p. 1047-1051, 2009.

KRAJAEJUN, T.; KUNAKORN, M.; NIEMHOM, S.; CHONGTRAKOOL, P.; PRACHARKTAM, R. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 378-382, 2002.

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. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 569-576, 2006a.

KRAJAEJUN, T.; KUNAKORN, M.; PRACHARKTAM, R.; CHONGTRAKOOL, P.; SATHAPATAYAVONGS, B.; CHAIPRASERT, A.; VANITTANAKOM, N.; CHINDAMPORN, A.; MOOTSIKAPUN, P. Identification of a novel 74-Kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1674-1680, 2006b.

KRAJAEJUN, T.; KEERATIJARUT, A.; SRIWANICHRAK, K.; LOWNNOO, T.; RUJIRAWAT, T.; PETCHTHONG, T.; YINGYONG, W.; KALAMBAHETI, T.; SMITHIPAT, N.; JUTHAYOTHIN, T.; SULLIVAN, T. D. 74-kiloDalton immunodominant antigen of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* is a putative exo-1,3- β glucanase. **Clinical and Vaccine Immunology**, 2010 (*in advance*).

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

LEAL, A. T.; LEAL, A. B. M.; FLORES, E. F.; SANTURIO, J. M. Pitiose. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 735-743, 2001b.

LEAL, A. T.; SANTURIO, J. M.; LEAL, A. B. M.; CATTO, J. B.; FLORES, E. F.; LUBECK, I.; ALVES, S. H. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum* antigens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 15, n. 2, p. 63-68, 2005.

MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; CAMARGO, R. M. P.; MARQUES, M. E. A. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 483-485, 2006.

McMULLAN, W. C.; JOYCE, J. R.; HANSELKA, D. V.; HEITMANN, J. M. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 11, p. 1293-1298, 1977.

MEIRELES, M. C. A.; RIET-CORREA, F.; FISCHMAN, O.; ZAMBRANO, A. F. H.; ZAMBRANO, M. S.; RIBEIRO, G. A. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**, v. 36, n. 3-4, p. 139-142, 1993.

MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**, v. 94, n. 2, p. 123-129, 1986a.

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

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

MENDOZA, L.; ALFARO, A. A.; VILLALOBOS, J. Bone lesions caused by *Pythium insidiosum* in a horse. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, n. 1, p. 5-12, 1988.

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

MENDOZA, L.; VILLALOBOS, J.; CALLEJA, C. E.; SOLIS, A. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosum in horses. **Mycopathologia**, v. 119, n. 2, p. 89-95, 1992a.

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

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

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

MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; MANDY, W.; GLASS, R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.

MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2797-2804, 2003.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical mycology**, v. 43, n. 6, p. 477-486, 2005.

MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 8, p. 377-382, 1981.

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

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Immunological studies on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, n. 6, p. 227-231, 1982b.

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

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**, v. 21, n. 4, p. 331-341, 1983b.

MILLER R. I.; CAMPBELL, R. S. F. The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 3, p. 325-332, 1984.

MILLER, R. I. Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 5, p. 473-478, 1985a.

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

MONTEIRO, A. B. 1999. **Imunoterapia da pitiose eqüina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente**

pele *Pythium insidiosum*. 1999. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

MURRAY, D. R.; LADDS, P. W.; JOHNSON, R. H.; POTT, B. W. Metastatic phycomycosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 7, p. 834-836, 1978.

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

PEREIRA, D. I. B.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; ARGENTA, J. S.; PÖTTER, L.; SPANAMBERG, A.; FERREIRO, L. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 1168-1171, 2007.

PÉREZ, R. C.; LUIS-LEÓN, J. J.; VIVAS, J. L.; MENDOZA, L. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1-2, p. 121-128, 2005.

PUPAIBOOL, J.; CHINDAMPORN, A.; PATARAKUL, K.; SUANKRATAY, C.; SINDHUPHAK, W.; KULWICHIT, W. Human pythiosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 517-518, 2006.

RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 3, p. 262-269, 2005.

REIS, J. L. Jr.; CARVALHO, E. C. Q.; NOGUEIRA, R. H. G.; LEMOS, L. S.; MENDOZA, L. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 289-295, 2003.

RIVIERRE, C.; LAPRIE, C.; GUIARD-MARIGNY, O.; BERGEAUD, P.; BERTHELEMY, M.; GUILLOT, J. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.

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

RODRIGUES, A.; GRAÇA, D. L.; FONTOURA, C.; CAVALHEIRO, A. S.; HENZEL, A.; SCHWENDLER, S. E.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Intestinal dog pythiosis in Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 16, n. 1, p. 37-41, 2006.

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

SANAVRIA, A.; FABRIS, V. E.; CAMPOS, S. G.; PEIXOTO, P. F. V.; MORAIS, M. C.; FERNANDES, C. G. N. Pitiose em eqüinos: relato de cinco casos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 170-173, 2000.

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

SANTOS, M. N.; METZDORF, L. L.; BRAGA, M. M.; WOLLE, C. A. Pitiose cutânea em eqüinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, p. 57-61, 1987.

SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, A. B., LEAL, A. T.; KOMMERS, G. D.; SOUSA, R. S.; CATTO, J. B. Cutaneous pythiosis insidiosii in calves from the pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, n. 3, p. 123-125, 1998.

SANTURIO, J. M.; LEAL, A. T.; LEAL, A. B. M.; FESTUGATTO, R.; LUBECK, I.; SALLIS, E. S. V.; COPETTI, M. V.; ALVES, S. H.; FERREIRO, L. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosii developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2535-2540, 2003.

SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; PEREIRA, D. B.; ARGENTA, J. S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006a.

SANTURIO, J. M.; LEAL, A. T.; LEAL, A. B. M.; ALVES, S. H.; LUBECK I.; GRIEBELER, J.; COPETTI, M. V. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

SATHAPATAYAVONGS, B.; LEELACHAIKUL, P.; PRACHAKTAM, R.; ATICHARTAKARN, V.; SRIPHOJANART, S.; TRAIRATVORAKUL, P.; JIRASIRITHAM, S.; NONTASUT, S.; EURVILAICHIT, C.; FLEGEL, T. Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.

SCHURKO, A. M.; MENDOZA, L.; LÉVESQUE, C. A.; DÉSAULNIERS, N. L.; DE COCK, A. W.; KLASSEN, G. R. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycological Research**, v. 107, n. 5, p. 537-544, 2003.

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

SHENEP, J. L.; ENGLISH, B. K.; KAUFMAN L.; PEARSON, T. A.; THOMPSON, J. W.; KAUFMAN, R. A.; FRISCH, G.; RINALDI, M. G. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

TABOSA, I. M.; MEDEIROS, V. T.; DANTAS, A. F. M.; AZEVEDO, E. O.; MAIA, J. C. Pitiose cutânea em eqüideos no semi-árido da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 27-30, 1999.

THITITHANYANONT, A.; MENDOZA, L.; CHUANSUMRIT, A.; PRACHARKTAM, R.; LAOTHAMATAS, J.; SATHAPATAYAVONGS, B.; LOLEKHA, S.; AJELLO, L. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1394-1400, 1998.

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

VANITTANAKOM, N.; SUPABANDHU, J.; KHAMWAN, C.; PRAPARATTANAPAN, J.; THIRACH, S.; PRASERTWITAYAKIJ, N.; LOUTHRENOO, W.; CHIEWCHANVIT, S.; TANANUVAT, N. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 3970-3974, 2004.

WANACHIWANAWIN, W.; MENDOZA, L.; VISUTHISAKCHAI, S.; MUTSIKAPAN, P.; SATHAPATAYAVONGS, B.; CHAIPRASERT, A.; SUWANAGOOL, P.; MANUSKJATTI, W.; RUANGSETAKIT, C.; AJELLO, L. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3613-3621, 2004.