

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Taiara Müller da Silva

**CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES VASCULARES NA PITIOSE EM  
CÃES E EQUÍDEOS**

Santa Maria, RS  
2021

**Taiara Müller da Silva**

**CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES VASCULARES NA PITIOSE EM  
CÃES E EQUÍDEOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> PhD Glaucia Denise Kommers

Santa Maria, RS  
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Silva, Taiara Müller da  
CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES VASCULARES NA PITIOSE EM  
CÃES E EQUÍDEOS / Taiara Müller da Silva.- 2021.  
78 p.; 30 cm

Orientador: Glaucia Denise Kommers  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Pitiose 2. Pythium insidiosum 3. Oomiceto 4.  
Equinos 5. Cães I. Kommers, Glaucia Denise II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, TAIARA MÜLLER DA SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Taiara Müller da Silva**

**CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES VASCULARES NA PITIOSE EM  
CÃES E EQUÍDEOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária.**

**Aprovado em 30 de junho de 2021:**

---

**Glaucia Denise Kommers, PhD (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Mariana Martins Flores, Dra. (UFSM)**

---

**Maria Elisa Trost, Dra. (UNIPAMPA)**

---

**Antonio Flávio Medeiros Dantas, Dr. (UFCEG)**

---

**Glauco José Nogueira de Galiza, Dr. (UFCEG)**

Santa Maria, RS  
2021

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esta tese aos meus pais, Levi e Tânia.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço pela vida.

Aos meus pais, Levi e Tânia, agradeço por todo o apoio, força, compreensão, amor, atenção e auxílio incondicionais que me permitiram chegar neste dia.

À minha família agradeço por todo apoio e carinho.

Ao meu namorado, João, agradeço pelo carinho, atenção, paciência, amor, compreensão, amizade e apoio. À sua família também agradeço pelo acolhimento e carinho para comigo.

À Santa Maria, agradeço pelo acolhimento e pelas oportunidades que tive nesta terra.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV-UFSM), que foram minha segunda casa, sou grata pelas oportunidades, pela estrutura, organização e qualidade para me auxiliar no desenvolvimento profissional e pessoal.

À todos os professores que tive até aqui, agradeço por cada ensinamento, em especial à minha orientadora, Glaucia, pelas oportunidades, confiança, amizade e por todos os ensinamentos e orientação durante a graduação, mestrado e doutorado.

Aos colegas que tive durante os 8 anos de LPV-UFSM, agradeço cada ensinamento. E aos amigos que aqui adquiri, agradeço pelo apoio, companheirismo, ajuda, amizade e momentos felizes.

À todos os meus amigos agradeço pelo apoio, carinho e amizade durante todos estes anos.

À toda a equipe do Laboratório Axys Análises, meu primeiro local de trabalho, em especial aos colegas do Setor de Patologia, agradeço pelo acolhimento, ensinamentos e amizade.

A todos aqueles que de alguma forma fizeram parte da minha jornada até aqui.

*A vida é feita de momentos, momentos pelos  
quais temos que passar, sendo bons ou não,  
para o nosso aprendizado. Nada é por acaso.  
Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar  
o nosso papel no palco da vida, lembrando de  
que a vida nem sempre segue o nosso querer,  
mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.*

*Chico Xavier*

## RESUMO

# CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES VASCULARES NA PITIOSE EM CÃES E EQUÍDEOS

AUTORA: Taiara Müller da Silva  
ORIENTADORA: Glauca Denise Kommers

Pitiose é uma doença infecciosa causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*. Esta enfermidade acomete humanos e diversas espécies animais. Em humanos, a forma vascular é a apresentação clínica mais comum, na qual são observadas hifas na parede de artérias, com desenvolvimento de aneurismas e trombose, podendo levar à amputação de membros, entre outras consequências. Em animais, a ocorrência de lesões vasculares já foi citada por diversos autores, no entanto, o detalhamento destas lesões e o seu possível papel na patogênese da pitiose ainda não foram estudados mais profundamente. Assim, os objetivos desta tese foram (1) caracterizar as lesões vasculares da pitiose em cães e equinos, determinando a presença e a localização das hifas na parede dos vasos sanguíneos afetados; (2) explorar o modo como as lesões da pitiose canina evoluem e se disseminam para os tecidos adjacentes; (3) assim como também buscar compreender o papel dos vasos sanguíneos no desenvolvimento dos kunkers na pitiose equina; (4) e descrever um caso incomum de pitiose intestinal em um equino. No primeiro estudo, a reavaliação histológica das lesões permitiu determinar a localização das hifas principalmente na parede de artérias, e em menor quantidade no lúmen dos vasos ou em meio a trombos, sugerindo que na pitiose canina, a ocorrência de embolismo seja infrequente em comparação à pitiose em humanos ou a infecções fúngicas em cães. A observação de intensa inflamação e de hifas adjacentes aos vasos sanguíneos (perivasculite) sugere fortemente que as hifas utilizam a parede dos vasos sanguíneos como um caminho, e que as lesões e hifas se disseminam para os tecidos adjacentes por extensão (contiguidade). No segundo estudo, foram observadas hifas na parede de arteríolas e na periferia dos kunkers, muitas vezes se projetando levemente para fora dos kunkers, além de permanecerem no sentido longitudinal das fibras colágenas, presentes no interior de alguns kunkers. Estes achados, somados à observação de kunkers com ramificações semelhantes a vasos sanguíneos, sugerem que as hifas utilizem as artérias como um caminho, e que a formação dos kunkers ocorra pela extensão direta do processo inflamatório, semelhante ao que parece ocorrer nos cães, porém formando as concreções (kunkers) de forma tridimensional. No terceiro artigo, foi descrito o primeiro caso de pitiose segmentar intestinal em um equino, no Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM, em 56 anos de rotina diagnóstica.

**Palavras-chave:** Pitiose. *Pythium insidiosum*. Oomiceto. Equinos. Cães. Patogênese. Lesões vasculares. Histoquímica.



## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF VASCULAR LESIONS IN PYTHIOSIS IN DOGS AND HORSES

AUTHOR: Taiara Müller da Silva  
ADVISOR: Glaucia Denise Kommers

Pythiosis is an infectious disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*. This disease affects humans and several animal species. In humans, the vascular form is the most common clinical presentation of pythiosis, where hyphae are observed on the artery wall, with the development of aneurysms and thrombosis, which can lead to limb amputation, among other consequences. In animals, the occurrence of vascular lesions has already been cited by several authors, however, the details of these lesions and their possible role in the pathogenesis of pythiosis have not been studied further. Thus, the objectives of this study were (1) to characterize the vascular lesions in dogs and horses, determining the presence and location of hyphae in the wall of the affected blood vessels; (2) to investigate how canine pythiosis lesions evolve and spread to adjacent tissues, (3) as well as to seek to understand the role of blood vessels in the development of kunkers in equine pythiosis; (4) and describe an unusual case of intestinal pythiosis in a horse. In the first study, the histological reassessment of the lesions made it possible to determine the location of the hyphae, mainly in the artery wall, rather than in the lumen of the vessels or inside thrombi, suggesting that in canine pythiosis, the occurrence of embolism is uncommon in comparison to pythiosis in humans or fungal infections in dogs. The observation of intense inflammation and hyphae adjacent to blood vessels (perivasculitis) strongly suggests that hyphae use the blood vessel wall as a pathway and that lesions and hyphae spread to adjacent tissues by extension (contiguity). In the second study, hyphae were observed on the wall of the arterioles and on the periphery of the kunkers, often slightly protruding out of the kunkers, in addition to remaining in the longitudinal direction of the collagen fibers, present inside some kunkers. These findings, added to the observation of kunkers with blood vessel-like ramifications, indicate that hyphae use arteries as a pathway and that the formation of kunkers occurs through the extension of the inflammatory process, similar to what occurs in dogs, forming the concretions of three-dimensional shape. In the third article, the first case of intestinal segmental pythiosis was described in an equine, at the Veterinary Pathology Laboratory of UFSM, in 56 years of diagnostic routine.

**Keywords:** Pythiosis. *Pythium insidiosum*. Oomycete. Horses. Dogs. Pathogenesis. Vascular lesions. Histochemistry.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1	HISTÓRICO .....	12
2.2	DEFINIÇÃO.....	12
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	13
2.4	APRESENTAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	13
2.5	PATOGÊNESE .....	15
2.6	ANGIOINVASIVIDADE E DISSEMINAÇÃO .....	17
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	19
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	42
<b>5</b>	<b>ARTIGO 3</b> .....	58
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	73
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77

# 1 INTRODUÇÃO

Pitiose é uma doença inflamatória crônica causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* (DE COCK et al., 1987). A ocorrência da doença está intimamente relacionada à presença das formas infectantes (zoósporos biflagelados móveis) que se desenvolvem em plantas aquáticas de ambientes úmidos e quentes. Quando livres na água, os zoósporos são atraídos por outras plantas, pelos, pele ou mucosas de animais e humanos, fixando-se e emitindo um tubo germinativo que invade os tecidos (GROOTERS, 2003; MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989). Tanto em animais como em humanos, os zoósporos aderem e penetram a pele ou mucosas através de lesões prévias, colonizando os tecidos (SANTURIO et al., 2006).

Os equinos são a espécie animal mais comumente afetada pela pitiose, com envolvimento predominantemente cutâneo e subcutâneo, enquanto os cães desenvolvem principalmente a forma gastrointestinal. Apesar disso, outros órgãos de cães e equinos podem ser acometidos (GROOTERS, 2003). Em humanos, as lesões cutâneas e arteriais nos membros inferiores são as mais frequentes (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989), e somente nesta espécie é bem reconhecida a migração das hifas pela parede de artérias dos membros afetados como parte importante na patogênese e disseminação da doença (REANPANG et al., 2015; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989).

Em estudos em animais domésticos e de experimentação, já foi descrita a presença de hifas no lúmen ou na parede de vasos sanguíneos (FRADE et al., 2017; MILLER; CAMPBELL, 1984; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005; TONDOLO et al., 2017; VERDI et al., 2018), porém não está bem esclarecido o papel e a importância destas lesões resultantes da angioinvasão na patogênese da doença, ou mesmo a caracterização das lesões vasculares e o modo como elas se desenvolvem. Além disso, as lesões vasculares e a forma como as mesmas se desenvolvem são pobremente caracterizadas em animais.

Desta forma, os objetivos desta tese foram caracterizar as lesões vasculares por pitiose em amostras de tecidos de cães e equinos recebidos como biópsias ou dos animais submetidos a necropsias, buscando determinar a localização das hifas na parede dos vasos sanguíneos afetados, assim como também investigar o modo como as lesões da pitiose canina evoluem e se disseminam para os tecidos adjacentes. Quanto aos equinos, buscou-se compreender o

papel dos vasos sanguíneos no desenvolvimento dos kunkers, bem como descrever um caso incomum de pitiose intestinal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO

Os primeiros relatos da doença conhecida como pitiose ocorreram na Índia em 1884. Neste país, a denominação da doença era *bursattee*, derivada da palavra *burus* (=chuva), pois as infecções se davam nos períodos mais chuvosos (SMITH, 1884 apud MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). Em 1901, na Indonésia, a doença passou a ser chamada de *hyphomycoses destruens*. Nesta época, os estudiosos Hann & Hoogkamer chegaram a isolar o agente, porém não conseguiram a sua esporulação. Em 1902, Haan modificou o nome para *hyphomycoses destruens equi*. Por muitos anos, estes termos foram usados indiscriminadamente para descrever habronemíase cutânea e, enquanto a etiologia “fúngica” não era confirmada, acreditava-se que o nematódeo *Habronema* estava envolvido no desenvolvimento dos granulomas cutâneos (GAASTRA et al., 2010). Somente em 1961, que micro-organismos filamentosos foram isolados em ambiente estéril (BRIDGES; EMMONS, 1961).

Atualmente, a doença causada pelo oomiceto *P. insidiosum* é denominada pitiose. No entanto, as primeiras descrições da doença receberam nomes como *swamp cancer*, *leeches*, *bursattee*, *hyphomycosis destruens-equi*, *granular dermatitis*, *espundia*, *summer sores*, *kunker*, e *equine phycomycosis* (GAASTRA et al., 2010). O termo *kunker*, que ainda é utilizado nos dias de hoje, se refere às massas encontradas no interior das feridas dos equinos e que, morfológicamente, se assemelham a corais marinhos. Tal termo começou a ser utilizado na Ásia. Em 1980 o termo pitiose foi proposto para substituir os nomes citados acima e, em 1987, foi descrita a reprodução sexuada do agente, possibilitando classificar o microorganismo causador da pitiose como *Pythium insidiosum* (DE COCK et al., 1987).

### 2.2 DEFINIÇÃO

Pitiose é uma doença inflamatória crônica e granulomatosa causada por *Pythium insidiosum* (DE COCK et al., 1987), um oomiceto pertencente ao filo Straminipila, classe Oomycetes, ordem Pythiales e família Pythiaceae (GAASTRA et al., 2010). Este é um agente ubíquo no solo e em ambientes aquáticos com distribuição global (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993), que acomete humanos e diversas espécies animais

(GAASTRA et al., 2010), além de ser um importante patógeno de plantas (LUMSDEN et al., 1976).

Equinos, cães, bovinos e humanos são as espécies mais acometidas (GAASTRA et al., 2010). Outras espécies animais menos acometidas são ovinos (TABOSA et al., 2004; PESSOA et al., 2012), gatos (RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005) e animais silvestres como camelo, onça pintada, tigre de bengala (BUERGELT; POWE; WHITE, 2006; CAMUS; GROOTERS; AQUILAR, 2004; VIDELA et al., 2012; WELLEHAN et al., 2004) e aves (PESAVENTO et al., 2008; SOUTO et al., 2019).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

Os equinos são a espécie mais acometida por pitiose, seguida dos cães e humanos. Não há predileção por sexo, idade e raça nos equinos e humanos, mas a maioria dos cães afetados tem aproximadamente três anos, são machos e de raças de grande porte (MILLER, 1985), possivelmente porque animais deste porte vivem em zonas rurais onde há, frequentemente, açudes e lagos. Estes locais favorecem a ocorrência dos zoósporos móveis (forma infectante) do *P. insidiosum* (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993).

Os zoósporos são estruturas globosas com dois flagelos que facilitam a sua movimentação dentro da água. Estas estruturas desenvolvem seu ciclo biológico em plantas aquáticas de ambientes quentes, visto que a temperatura necessária para a reprodução dos zoósporos fica entre 30 e 40 °C. Assim, a maior ocorrência dos casos de pitiose está atribuída às regiões com estas características (umidade e calor). Acredita-se que durante o contato da mucosa ou pele dos hospedeiros com os zoósporos, haja liberação de uma substância pegajosa que os adere e permite o seu encistamento na superfície afetada. A partir disso, há a formação de um tubo germinativo e formação das hifas que penetram semelhantemente a ponta de uma agulha, exercendo força mecânica sobre os tecidos. Esta ação mecânica, somada a ação de enzimas, facilitariam o crescimento invasivo e a colonização tecidual (GAASTRA et al., 2010; MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; RAVISHANKAR et al., 2001).

### 2.4 APRESENTAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

As formas clínicas de apresentação da pitiose e os sinais clínicos são característicos de cada espécie acometida. Os equinos são a espécie mais acometida e desenvolvem lesões

principalmente na pele e no tecido subcutâneo, onde há a formação de massas ulceradas que se localizam particularmente nas regiões ventrais do corpo, como as patas, região esternal e inguinal, que, de forma geral, as lesões mais acometidas estão em maior contato com águas contaminadas. Estas massas que se formam, caracterizam-se por aumentos de volume ulcerados dos quais flui conteúdo serossanguinolento. Esta é a única espécie que apresenta no interior das massas, pequenas estruturas ramificadas, friáveis e amareladas podem ser facilmente removidas e que são denominadas de *kunkers* (MILLER; CAMPBELL, 1984). Além da forma cutânea, em equinos, já foram descritas lesões intestinais (BROWN; ROBERTS, 1988), pulmonares (GOAD, 1984), ósseas (MENDOZA; ALFARO; VILLALOBOS, 1988) e disseminadas em equinos (REIS et al., 2003). Microscopicamente, as lesões de pitiose equina são caracterizadas por áreas com tecido de granulação adjacente a áreas com acentuado infiltrado inflamatório de eosinófilos e necrose eosinofílica que caracterizam os *kunkers* observados macroscopicamente. As hifas podem estar íntegras ou degeneradas e estão localizadas tanto no centro, como na periferia dos *kunkers*, porém geralmente não são observadas fora dos *kunkers* (MARTINS et al., 2012).

Os cães são a segunda espécie mais acometida e, por sua vez, comparando à forma cutânea, desenvolvem principalmente a forma gastrointestinal. Na forma gastrointestinal, há formação de aumentos de volume brancacento na parede de estômago e/ou intestino. Estes aumentos frequentemente obstruem o lúmen dos órgãos, podendo levar, no caso de comprometimento intestinal, a quadros de obstrução, com sinais clínicos de diarreia, dor abdominal e aumentos de volume, que podem ser confundidos com neoplasias intra-abdominais (MILLER, 1985). Além disso, estas lesões podem ou não se disseminar para outros órgãos, com consequências clínicas correspondentes aos órgãos afetados. Nos cães, não há a formação de *kunkers*, como nos equinos, porém, na superfície de corte das lesões, também podem ser observadas áreas amarelas (necrose) não destacáveis como os *kunkers*, entremeadas por áreas brancacentas (TROST et al., 2009). Na forma cutânea, as lesões podem se localizar em múltiplos lugares e geralmente são aumentos de volume ulcerados que dificilmente cicatrizam (GAASTRA et al., 2010). Ambas as formas clínicas em um mesmo animal são raras, mas já foram relatadas na literatura (RECH; GRAÇA; BARROS, 2004).

Nos cães, observam-se microscopicamente três padrões inflamatórios, podendo todos eles ocorrer em um mesmo caso. No padrão necro-eosinofílico, as hifas ficam no interior de áreas constituídas por infiltrado inflamatório de eosinófilos necróticos e debris celulares formando pequenas massas, semelhantes ao estágio inicial de *kunkers* em equinos. Neste

padrão, é possível também observar hifas não coradas, com um halo eosinofílico ao redor, semelhante à reação de Splendore-Hoeppli. O padrão granulomatoso é formado unicamente por infiltrado inflamatório de macrófagos epitelioides e formação de células gigantes multinucleadas. Neste, por sua vez, as hifas têm uma apresentação mais desintegrada, sugerindo uma resposta inflamatória/imunológica mais efetiva. O padrão piogranulomatoso é uma mistura do padrão inflamatório necro-eosinofílico e granulomatoso com infiltrado constituído por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células gigantes (MARTINS et al., 2012).

Humanos têm uma grande variedade de apresentações clínicas exibindo quatro formas clínicas: cutânea/subcutânea, ocular, vascular e disseminada (REANPANG et al., 2015). Na forma cutânea, as lesões ocorrem principalmente nos braços ou pernas, e caracterizam-se por úlceras e aumentos de volume. Geralmente, estas lesões ocorrem em consequência do contato de trabalhadores rurais que ficam com os membros inferiores imersos em águas contaminadas. Esta forma é muito comum em países asiáticos com extensas áreas de plantação de arroz, onde a colheita é feita manualmente. Na forma vascular, as lesões ocorrem principalmente em vasos dos membros inferiores e caracterizam-se por trombos ou aneurismas em artérias, tendo como principal consequência, a amputação de membros. Geralmente, estas lesões evoluem a partir de lesões cutâneas. Na forma ocular, os pacientes apresentam úlcera de córnea, ceratite e dor intensa, que geralmente ocorrem após algum episódio de trauma ocular. Nestes casos, é muito comum a necessidade de enucleação do globo ocular pela dificuldade do tratamento. Em humanos é muito frequente a observação de pitiose em pacientes talassêmicos ou com outras co-morbidades, no entanto, em animais possíveis doenças pré-existentes ainda não foram determinadas (KRAJAEJUN et al., 2006; REANPANG et al., 2015; SANTURIO et al., 2006; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989). Semelhante aos humanos, em cães, equinos e gatos, também já foram mencionadas lesões vasculares e hifas na parede de vasos sanguíneos (MARTINS et al., 2012; MILLER; CAMPBELL, 1984; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005).

## 2.5 PATOGÊNESE

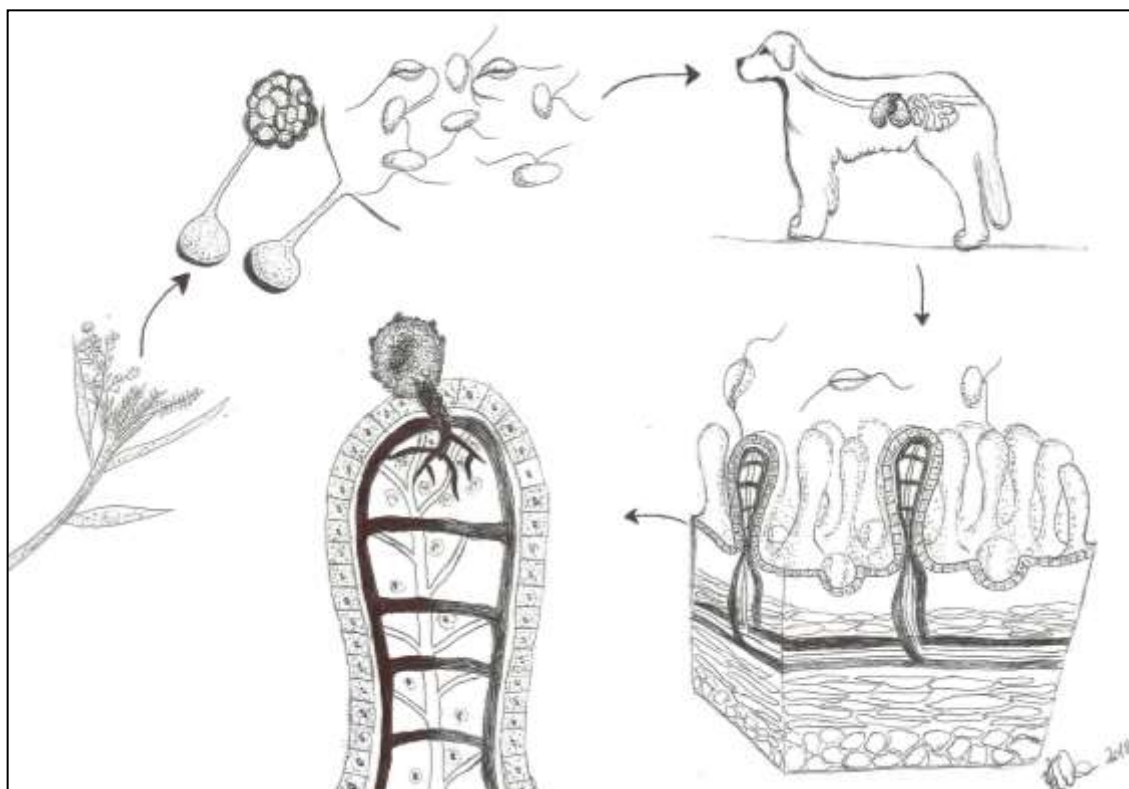
A ocorrência da pitiose está intimamente associada com a presença das formas infectantes (zoósporos) (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). Assim, a ocorrência da doença se dá em regiões com clima úmido e quente, que propiciam um ambiente adequado



para o ciclo biológico de *P. insidiosum*, que ocorre em plantas aquáticas (GROOTERS, 2003; MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). Das plantas aquáticas são liberadas as formas infectantes (zoósporos biflagelados móveis) que, quando livres na água, têm quimiotaxia por plantas, pelos e feridas de animais e humanos, fixando-se e encistando, após a liberação de substância pelo zoósporo, seguida da emissão de um tubo germinativo que invade os tecidos (GROOTERS, 2003; MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989). A Figura 1 exemplifica o ciclo dos zoósporos até o início das lesões. A penetração nos tecidos pelas hifas ocorre pela ação mecânica incidida pela ponta das hifas, semelhante à ponta de uma agulha associada à liberação de glicoproteínas que destroem o tecido e facilitam a penetração e invasão das hifas (GAASTRA et al., 2010; MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; RAVISHANKAR et al., 2001). A colonização dos tecidos pelas hifas induz uma resposta inflamatória, com a produção variável de tecido fibrovascular (de granulação) e, conseqüentemente, as lesões nos locais predispostos, conforme a espécie acometida (MARTINS et al., 2012).

Em humanos, as lesões cutâneas e arteriais nos membros inferiores são mais frequentes (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989), e somente nesta espécie é bem reconhecida a migração das hifas pela parede de artérias dos membros afetados como parte importante na patogênese e disseminação da doença (REANPANG et al., 2015; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989). Estudos disponíveis na literatura veterinária sugerem que as lesões de pitiose canina possam se disseminar por extensão ou por via linfática para outros órgãos (FRADE et al., 2017; MILLER, 1985). No entanto, apesar de alguns estudos em amostras animais citarem a presença de hifas no lúmen ou na parede de vasos sanguíneos (MARTINS et al., 2012; MILLER; CAMPBELL, 1984; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005), não há artigos científicos buscando descrever as lesões e o modo como elas se desenvolvem.

Figura 1 – Representação do ciclo biológico de *Pythium insidiosum* em meio aquático (os oomicetos se reproduzem nas plantas aquáticas e os esporângios liberam os zoósporos [forma infectante]). No exemplo, os cães ingerem a água contaminada e no intestino os zoósporos se aderem à mucosa, fixando-se sobre a superfície pela liberação de substâncias pegajosas, encistam e emitem o tubo germinativo, a partir do qual as hifas iniciam a formação do micélio e penetram os tecidos. Fonte: autor.



## 2.6 ANGIOINVASIVIDADE E DISSEMINAÇÃO

Diversos fungos como *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Absidia* spp. e *Mortierella* spp. podem ser angioinvasivos. Angioinvasividade é a capacidade de alguns agentes infecciosos colonizarem a pele ou mucosas, e invadirem a parede e o lúmen vascular. Muitas vezes, ocorre ainda disseminação para órgãos distantes, além de doença causada pela possibilidade de tromboembolismo destes fungos (MOISER, 2017). Muitos casos de tromboembolismo e disseminação fúngica já foram descritos na literatura humana (DELONE et al., 1999; MIAUX et al., 1995) e em animais em menor quantidade (ALVES et al., 2020).

Acredita-se que os fungos liberam uma substância denominada elastase, capaz de digerir a parede vascular elástica, facilitando a sua invasão. Essa destruição ainda leva à fragilidade da parede vascular, com conseqüente formação de aneurismas. Além disso, muitos fungos desenvolvem trombos com grande quantidade de hifas, facilitando a sua embolização para órgãos distantes (NORLINAH; NGOW; HAMIDON, 2007).

Traçando um paralelo destas características com doenças causadas por oomicetos, em humanos com pitiose, a forma mais comum da doença é a forma vascular. Porém, diferentemente dos fungos, não há embolização para outros órgãos. O que comumente ocorre é a disseminação das hifas pela parede de artérias, principalmente de membros inferiores, com aneurisma ou oclusão vascular com conseqüente isquemia, tendo como desfecho comum a amputação dos membros afetados (KRAJAEJUN et al., 2006; REANPANG et al., 2015; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989). Apesar de muito se saber sobre a pitiose humana, nos animais a realidade ainda não é a mesma. Alguns artigos científicos em diferentes espécies animais com pitiose já citaram lesão vascular ou hifas na parede de vasos sanguíneos (FRADE et al., 2017; MARTINS et al., 2012; MILLER; CAMPBELL, 1984; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005) e, em menor frequência, já foram observadas lesões vasculares em estudos experimentais utilizando camundongos (TONDOLO et al., 2017). Recentemente, em um cão infectado por *Lagenidium giganteum* forma *caninum*, outro oomiceto, foi observada lesão cutânea e extensão da lesão atingindo o encéfalo, com formação de trombose e isquemia local (SHMALBERG et al., 2020).

### **3 ARTIGO 1 - CHARACTERIZATION OF THE VASCULAR LESIONS OF GASTROINTESTINAL AND CUTANEOUS PYTHIOSIS IN DOGS**

Artigo a ser submetido à revista *Journal of Comparative Pathology*.

1 **INFECTIOUS DISEASE**

2  
3 **Short Title: Vascular Lesions of Pythiosis in Dogs**

4  
5 **Characterisation of the Vascular Lesions of Gastrointestinal and Cutaneous Pythiosis in**  
6 **Dogs**

7  
8  
9 **T. M. Silva, E. C. Lamego, M. B. Ambrosio, S. M. P. Melo, M. M. Flores, R. A. Figuera,**  
10 **L. F. Irigoyen and G. D. Kommers\***

11  
12 *Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de*  
13 *Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria-RS, Brazil*

14  
15  
16  
17  
18  
19 **\*Corresponding author: E-mail: [glaukommers@yahoo.com](mailto:glaukommers@yahoo.com)**

20

21

22

23

24

25

26

## Summary

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44 *Keywords: Pythium insidiosum; Dog; Angioinvasion; Dissemination*

45

46

## Introduction

47

48

49

50

Pythiosis is an infectious disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum* that primarily affects dogs, horses, cattle and humans. It can cause severe vascular lesions in humans, leading to aneurisms and ischaemic injuries. Although vascular lesions have been observed in animals on occasion, they are rarely described in detail. The current study aimed to characterise the vascular lesions associated with spontaneous canine pythiosis (gastrointestinal and cutaneous clinical forms). Moreover, a total of 18 cases of canine pythiosis were studied retrospectively. To better visualise hyphae inside the vascular lesions, the modified Grocott's methenamine silver (GMS) method with haematoxylin as a counterstain was used. In addition, the immunohistochemistry (IHC) technique for *Pythium insidiosum* was used to confirm the aetiology. A histological reassessment of the lesions revealed that vasculitis, accompanied by intralumenal hyphae, was a very common lesion, predominantly in the arteries. Furthermore, hyphae usually followed the direction of the arterial wall fibres. Along with hyphae, the marked inflammatory infiltrate in the vessel wall extends to adjacent tissues, resulting in perivasculitis. These findings suggest that hyphae may use the blood vessel wall as a pathway and that the perivascular inflammatory reaction allows hyphae to spread to adjacent tissues and organs via contiguity.

Pythiosis is a chronic inflammatory disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum* (De Cock *et al.*, 1987). Infectious forms of this oomycete (mobile biflagellate zoospores) are released from aquatic plants and have chemotaxis generated by plants, hair and wounds of animals and humans, fixing and emitting a germinative tube that invades tissues

51 (Sathapatayavongs *et al.*, 1989; Mendoza *et al.*, 1993; Grooters, 2003). The lesions are  
52 thought to develop as a result of mobile zoospores coming into contact with the skin or  
53 mucous membranes containing previous microlesions (Mendoza *et al.*, 1993; Grooters, 2003).

54 Dogs primarily develop the gastrointestinal (GI) form and, less frequently, the  
55 cutaneous form (Grooters, 2003), with rare reports of both forms coexisting (Rech *et al.*,  
56 2004). In the GI form, the probable sites of entry and colonisation of the agent are the gastric  
57 and/or intestinal mucosae. The oomycete may spread from these primary organs to the  
58 pancreas, mesenteric lymph nodes (Miller, 1985; Fischer *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 2006),  
59 liver (Frade *et al.*, 2017) and uterus (Miller, 1985; Frade *et al.*, 2017) on rare occasions.

60 Humans have a higher prevalence of cutaneous and arterial lesions in the lower limbs  
61 (Sathapatayavongs *et al.*, 1989), and only in this species, is the migration of hyphae through  
62 the artery wall of the affected limbs recognised as an important part of the pathogenesis and  
63 spread of the disease (Sathapatayavongs *et al.*, 1989; Reanpang *et al.*, 2015). According to  
64 studies published in the veterinary literature, oomycete lesions may spread to other organs via  
65 extension or a lymphatic pathway (Miller, 1985; Frade *et al.*, 2017). Only in a few studies in  
66 domestic and experimental animals was the presence of hyphae in the lumen or on the wall of  
67 blood vessels mentioned, but without going into detail about the possible role of  
68 angioinvasion in disease pathogenesis (Miller and Campbell, 1984; Rakich *et al.*, 2005; Frade  
69 *et al.*, 2017; Tondolo *et al.*, 2017; Verdi *et al.*, 2018; Souto *et al.*, 2020). Studies on  
70 *Lagenidium giganteum* infection in dogs demonstrated the ability of the agent to invade  
71 adjacent organs, as well as an angioinvasive characteristic (Grooters *et al.* 2003; Shmalberg *et*  
72 *al.*, 2020).

73 The purpose of this study was to characterise the histological vascular lesions of  
74 spontaneous canine pythiosis. We believe that this research will contribute to a better  
75 understanding of disease pathogenesis, with emphasis on the various ways hyphae

76 spread/propagate in an infected organ. Our main hypothesis is that hyphae use the blood  
77 vessel wall as a pathway to spread the lesions through contiguity.

78

79

## Materials and Methods

### 80 *Sample Characteristics*

81 A total of 18 cases of canine pythiosis diagnosed at the Laboratório de Patologia Veterinária  
82 (LPV) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)-RS, Brazil, were reviewed  
83 retrospectively. Moreover, six cases were submitted as biopsy specimens, three were  
84 histopathological examinations of necropsy samples (performed outside the LPV-UFSM), and  
85 nine were necropsied in the LPV-UFSM.

86 In each case, the clinical forms, location of the lesions and pattern of tissue  
87 inflammation were studied. Moreover, histopathological analysis was used to determine  
88 inflammatory patterns, which were classified into pyogranulomatous (PG), granulomatous  
89 (G) and necro-eosinophilic (NE), according to the literature (Martins *et al.*, 2012).

90 According to Gabriel *et al.* (2008) and modified by Martins *et al.* (2012), the aetiology  
91 of all cases in this study was previously confirmed by the immunohistochemistry (IHC) for  
92 *Pythium insidiosum* using a polyclonal antibody made in rabbit. The specificity of the reagent  
93 was confirmed as previously described (Martins *et al.*, 2012). Microbiological culture  
94 confirmed *P. insidiosum* in three cases (Cases 13, 15 and 18), and one case (Case 15) was  
95 submitted to polymerase chain reaction (PCR). A total of eight cases were part of other  
96 publications: Rech *et al.*, 2004 (Case 13); Rodrigues *et al.*, 2006 (Case 15); Trost *et al.*, 2009  
97 (Cases 5, 10, 13, 15 and 16); and Martins *et al.*, 2012 (Cases 2, 3, 5, 6, 10, 13, 15 and 16).

98

### 99 *Techniques Utilised*



100 All samples were fixed in 10% buffered formaldehyde before being processed routinely for  
101 histopathology. For histopathologic reassessment of the lesions, serial or semi-serial 3µm-  
102 thick sections were cut and stained with haematoxylin and eosin (HE) technique. Grocott's  
103 methenamine silver stain (GMS) was applied to additional sections. This technique was  
104 performed in accordance with the manufacturer's recommendations (Grocott kit, EasyPath),  
105 with modification of the counterstaining, using Harris' haematoxylin (for 90 seconds), to  
106 facilitate visualisation and to determine the location of the *P. insidiosum* hyphae in the  
107 vascular wall (distinguishing the affected layers, when possible) or in the lumen of blood  
108 vessels.

109

#### 110 *Characteristics of Vascular Lesions*

111 To characterise vascular lesions, the types of affected vessels (arteries, veins and lymphatic  
112 vessels) were identified according to pre-established histological patterns (Aughey and Frye,  
113 2001; Junqueira and Carneiro, 2013). The presence of vascular and/or perivascular  
114 inflammation was determined, and the extent of the lesion in the segmental or circumferential  
115 vascular wall was assessed. Furthermore, histochemical techniques were used to distinguish  
116 the presence of hyphae in the vascular wall and/or lumen, as well as the formation of thrombi.  
117 The presence of fibrinoid necrosis in the vascular wall was also evaluated in all of the cases  
118 studied.

119

120

## 120 **Results**

121 Vascular lesions consistent with vasculitis, detailed in Table 1, were observed in the  
122 vast majority of cases (15/18) and occurred regardless of the inflammatory pattern (PG, G or  
123 N-E). These changes primarily affected the artery wall (arteritis) (14/18) and, less frequently,  
124 the veins (phlebitis) (9/18). Vascular inflammation was either circumferential (13/18) or

125 segmental (11/18). Figures 1–6 show illustrations referring to microscopic lesions. There  
126 were no changes in lymphatic vessels in the sections analysed.

127         The predominant inflammatory infiltrate was pyogranulomatous (16/18), followed by  
128 necro-eosinophilic (12/18) and granulomatous (11/18). When seen within or on the vascular  
129 wall, hyphae were intact but disintegrated when seen inside the giant cells. Concomitantly, the  
130 same inflammation pattern was occasionally seen surrounding blood vessels, characterising  
131 perivasculitis with adventitial destruction. Perivasculitis could also be circumferential (13/18)  
132 or segmental (12/18).

133         Thrombosis was another common vascular lesion, characterised by the formation of  
134 fibrin thrombi interspersed with leukocytes and erythrocytes in the arterial (9/18) and venous  
135 (5/18) lumens. In Case 18, the thrombi (also visible grossly) were adjacent to the necrotic  
136 (ischaemic) areas, which were characterised by segmental rupture of the intestinal wall.  
137 Hyphae were seen inside venous and arterial thrombi in only two cases (2/18). Fibrinoid  
138 necrosis was rarely observed (3/18), and it was characterized by the deposition of strongly  
139 hyaline and dense eosinophilic material (fibrin) over the wall of small- and medium-calibre  
140 arteries, which could extend to tissue adjacent to the affected blood vessel.

141         The presence or absence of hyphae in the wall and/or in the vascular lumen was  
142 determined using HE and GMS techniques (modified). Both techniques showed a higher  
143 concentration of hyphae in the vascular wall than in the lumen, as shown in Table 2. Using the  
144 HE technique, the profiles of hyphae were observed in the walls of arteries (6/18) and veins  
145 (2/18) and only in three cases (3/18) in the lumen. Moreover, the GMS method improved  
146 visualization of hyphae, stained in black or dark brown within the artery (13/18) or venous  
147 (5/18) walls, as well as in the vascular lumen (7/18). In one case (Case 4), hyphae were  
148 observed inside peripheral nerves among the skeletal muscle of the skin sample sent. In cases  
149 where there was high concentration of hyphae in the sample, hyphae were also found within

150 the wall and lumen of apparently normal blood vessels. In three cases (3/18), no lesions or  
151 hyphae were observed in the blood vessel wall, but in these cases, the samples were sparse,  
152 with only a small amount of tissues submitted for analysis.

153 Clinically, 13 of the 18 cases (72.22%) had the GI form, 4 (22.22%) had the cutaneous  
154 form, and 1 (5.56%) had both forms. Table 2 shows the clinical form and lesion location for  
155 each dog. The cutaneous lesions corresponded to skin biopsies that contained nodules or  
156 masses. Sometimes they were ulcerated, with a multilobular appearance that was greyish, soft  
157 or firm. On the cut surface, multifocal yellowish and irregular nodules interspersed with  
158 greyish-white material were occasionally seen.

159 In the GI form, the large and the small intestines were affected in six cases each. In  
160 general, the intestinal lesions were segmental, with irregular masses predominantly affecting  
161 the submucosal, muscular and serous layers. The lesions generally extended to the region of  
162 the mesenteric insertion, resulting in swollen triangular areas. In all cases, the mucosa was  
163 preserved.

164 In ten cases, the mesentery was also affected. In one case (Case 18), mesenteric  
165 thrombi with necrosis of the adjacent intestinal segment were macroscopically observed (Fig.  
166 7). The stomach was affected in two cases by diffuse or segmental wall thickening. In five  
167 cases, mesenteric lymph nodes (MLNs) were affected and presented increase in volume,  
168 forming masses that hindered nodal delimitation. In two cases of biopsies involving MLNs,  
169 the segment of the intestine submitted did not show macroscopic or histological changes.

170 In three of the cases, the pancreas was affected, and in Case 17, there was diffuse  
171 pancreatic atrophy (secondary to granulomatous inflammation with fibrosis). All cases with  
172 pancreatic involvement had small intestine affected. Moreover, two dogs had the liver  
173 affected. Lesions were located in the region of the hepatic hilum and on the free edge of the  
174 left medial hepatic lobe. The large intestine was primarily affected in both dogs involved.

175           Microscopically, the inflammatory patterns PG, G and NE of the respective cases were  
176 determined, in order of prevalence (Table 1). In all these patterns, negative profiles of  
177 intralesional hyphae were observed, which could present mild basophilia and were  
178 characterized by longitudinal or transverse sections with diameters ranging from 5 to 10µm,  
179 variable length, almost parallel walls, rare septations and ramifications. The orientation of the  
180 hyphae within the vascular wall varied, but they were predominantly in the same direction as  
181 the smooth muscle fibres (Fig. 8).

182

183

### Discussion

184

185

186

187

188

189

190

The purpose of this study was to characterise the histological vascular lesions of spontaneous canine pythiosis. Additionally, vascular lesions were compared with what is described in humans (Imwidthaya *et al.*, 1994; Reanpang *et al.*, 2015). The presence of hyphae in the vascular wall of cases of pythiosis in humans is well recognized as an important part of the pathogenesis and spread of disease, which is not well understood in animals. Our data suggest that hyphae migrate locally via the blood vessel wall, which contributes to a better understanding of the pathogenesis of this disease in animals.

191

192

193

194

195

196

197

198

In the 18 cases of canine pythiosis evaluated in this study, there were no hyphae in the lymphatic vessels. However, the involvement of MLNs probably occurred in two ways: associated with intestinal injuries and as injuries apparently restricted to MLNs. According to the literature, hyphae can spread through lymphatic drainage when MLNs are involved in the presence of intestinal lesions. While in lesions confined to mesenteric lymph nodes, germ tubes and hyphae may form after zoospores adhere to the mucosal surface, and these rapidly invade the lymphatic system of the mucosa and submucosa, without colonization of the intestinal wall (Miller, 1985). Although no lesions or hyphae were found in lymphatic vessels

199 in this study, this possibility cannot be ruled out since lymphatic drainage was observed by  
200 Miller (1985).

201         The role of arterial and venous lesions in the pathogenesis and spread of pythiosis in  
202 domestic animals has received less attention than it does in humans. In the literature, vascular  
203 lesions are only mentioned in dogs with pythiosis (Miller, 1985; Trost *et al.*, 2009; Martins *et*  
204 *al.*, 2012; Frade *et al.*, 2017), horses (Miller and Campbell, 1984) and cats (Rakich *et al.*,  
205 2005, Souto *et al.*, 2020) and, recently, in experimental models using immunosuppressed  
206 mice (Tondolo *et al.*, 2017) and embryonated chicken eggs (Verdi *et al.*, 2018). Similar to the  
207 current study, vascular lesions such as thrombosis, vasculitis and perivasculitis have also been  
208 described in lagenidiosis, another disease caused by an oomycete (Grooters *et al.*, 2003,  
209 Shmalberg *et al.*, 2020). It is worth noting that in vascular lesions in the present study, an  
210 inflammatory reaction was always observed in the wall, in the outermost layer of the blood  
211 vessels, and adjacent to them (perivasculitis), whether this was circumferential or segmental.  
212 These characteristics suggest that hyphae may use the vascular wall as a path and spread to  
213 tissues and contiguous structures through the extension (contiguity) of the inflammatory  
214 process (Shmalberg *et al.*, 2020). Furthermore, the (peristaltic) movements of the organs  
215 within the abdominal cavity, which favour proximity and contact between organs that are not  
216 contiguous (such as a transcoelomic metastasis), could explain the involvement of different  
217 affected organs in the same case, such as the liver and large intestine (in Cases 11 and 12) or  
218 pancreas and jejunum (in Case 7). A hypothesis for tissue invasion by *P. insidiosum* would be  
219 the action of the tip of the germ tubes (after encysting) and hyphae, similar to the tip of a  
220 needle, exerting mechanical force on the tissues, which, together with the action of enzymes,  
221 would facilitate invasive growth and tissue colonization (Ravishankar *et al.*, 2001; Gastra *et*  
222 *al.*, 2010).

223           In the current study, vascular lesions were found primarily in arteries but also in veins.  
224   It is hypothesized that the higher prevalence of arterial lesions can be explained by the greater  
225   amount of elastin found in these structures. Miller and Campbell (1984) described hyphae in  
226   the vascular wall of arteries within equine kunkers, suggesting that they consumed vascular  
227   collagen as a metabolic substrate. In comparison, in *Aspergillus fumigatus* infections, the  
228   activity of elastase on elastin has already been proven as an important factor in the  
229   pathogenesis of aspergillosis (Blanco *et al.*, 2002), and this component is an important  
230   constituent of the wall of some blood vessels and conjunctive tissue (Junqueira and Carneiro,  
231   2013).

232           In humans, with the vascular form of pythiosis, hyphae were found on the proximal  
233   and intact surgical margins of affected arteries. This implies that hyphae may use the blood  
234   vessel wall as major route of dissemination (Sathapatayavongs *et al.*, 1989; Reanpang *et al.*,  
235   2015). Due to the counterstaining with haematoxylin, the use of the modified GMS technique  
236   allowed us to see the hyphae while also determining their location in the tissues. In cases  
237   where there was a large amount of hyphae, they were observed in the walls of apparently  
238   normal blood vessels. These findings support the hypothesis that hyphae use the blood vessel  
239   wall as a route of local dissemination. Although the presence of hyphae in the vascular wall is  
240   common in humans and allows for the invasion of contiguous structures, the mechanism and  
241   reason for the attraction of *P. insidiosum* hyphae by the blood vessel wall are not yet fully  
242   understood (Sathapatayavongs *et al.*, 1989).

243           In fungal infections such as zygomycosis and aspergillosis, hyphae frequently invade  
244   the blood vessel wall, causing thrombosis and coagulative necrosis (infarctions), as well as  
245   spreading to other organs as fungal emboli (Uzal *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2020). In this  
246   study, hyphae were observed in most cases in the artery wall and much less commonly in the  
247   lumen of blood vessels or inside thrombi, strongly disadvantaging the occurrence of

248 embolism as the main mode of dissemination in dogs, as seen in fungal infections in animals  
249 (Alves *et al.*, 2020), vascular pythiosis in humans (Hurst *et al.*, 2001; Chitasombata *et al.*,  
250 2018) and lagenidiosis in dogs (Grooters *et al.*, 2003; Shmalberg *et al.*, 2020). However, in  
251 experimental studies inoculating zoospores of *P. insidiosum* in immunosuppressed mice  
252 (Tondolo *et al.*, 2017) and embryonated chicken eggs (Verdi *et al.*, 2018), hyphae were  
253 observed in the blood vascular wall and lumen, with thrombi formation and probable embolic  
254 dissemination to organs, such as the liver and kidney (in mice). This fact indicates that there  
255 are major differences in the pathogenesis of pythiosis between species.

256         In one of the cases in this study, thrombi in the mesentery blood vessels probably led  
257 to ischaemia, resulting in necrosis and rupture of adjacent portions of the intestine. The  
258 mechanism in this case may be similar to that described by Verdi *et al.* (2018), in which  
259 thrombi prevented oxygenation and exchange of nutrients into the yolk sac, leading to the  
260 death of embryos. Therefore, while less common than vasculitis, the formation of  
261 intravascular thrombi is also a lesion seen in dogs with pythiosis, which can have serious  
262 consequences (infarctions). In humans, the development of thrombi and aneurysms in arteries  
263 causes serious consequences, such as necrosis and amputation, mainly of lower limbs  
264 (Imwidthaya, 1994; Reanpang *et al.*, 2015).

265         Based on the characterisation of vascular lesions and the visualization of *P. insidiosum*  
266 hyphae in the dogs of this study, it was possible to hypothesize that hyphae use the blood  
267 vessel wall as a propagation route. Thus, the hyphae would use the vascular wall as a  
268 framework, and the intense inflammatory reaction adjacent to these vessels (perivasculitis)  
269 would allow the lesions, together with the hyphae, to spread by extension (contiguity) and  
270 could also reach other organs when associated with peristaltic movements. The presence of  
271 hyphae mainly in artery walls and, to a lesser extent, in the vascular lumen or  
272 thrombidisadvantage the occurrence of embolism, which may explain the scarcity of cases

273 with disseminated lesions. Such characteristics continue to highlight the significant  
274 differences between the species affected by pythiosis, reinforcing the need for comparative  
275 studies.

276

277

### Acknowledgments

278 This work was supported financially by the Coordenação de Aperfeiçoamento de  
279 Pessoal de Nível Superior (CAPES). T. M. Silva has a fellowship from CAPES, and E. C.  
280 Lamego has a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do  
281 Sul (FAPERGS). The authors would like to express their gratitude to A. dos Santos and A. L.  
282 Prante for their technical support. G. D. Kommers has a fellowship from the Conselho  
283 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; PQ-1D #307358/2020-8).  
284 The authors are also grateful to the Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI-UFSM)  
285 for the anti-*Pythium insidiosum* antibody.

286

### References

288 Alves RC, Ferreira JS, Alves AS, Maia LA, Dutra V. *et al.* (2020) Systemic and  
289 Gastrohepatic Mucormycosis in Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, **175**, 90-94.

290

291 Aughey E, Frye F (2001) *Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates*. Iowa  
292 State University Press, Ames pp. 71-81.

293

294 Blanco JL, Hontecillas R, Bouza E, Blanco I, Pelaez T et al. (2002) Correlation between the  
295 elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*.

296

*Journal of Clinical Microbiology*, **40**, 1811-1813.

297



- 298 Chitasombata MN, Petchkuma P, Horsirimanontb S, Sornmayurac P, Chindampornd A et al.  
299 (2018) Vascular pythiosis of carotid artery with meningitis and cerebral septic emboli:  
300 A case report and literature review. *Medical Mycology Case Reports*, **21**, 57-62.  
301
- 302 De Cock AWAM, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L & Kaufman L (1987) *Pythium*  
303 *insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*,  
304 **25**, 344-349.  
305
- 306 Fischer JR, Pace LW, Turk JR, Kreeger JM, Miller MA *et al.* (1994) Gastrointestinal  
307 pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic*  
308 *Investigation*, **6**, 380-382.  
309
- 310 Frade MTS, Diniz PVN, Olinda RG, Maia LA, Galiza GJN (2017). Pythiosis in dogs in the  
311 semiarid region of Northeast Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **37**, 485-490.  
312
- 313 Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG et al. (2010) *Pythium*  
314 *insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology*, **146**, 1-16.  
315
- 316 Gabriel AL, Kommers GD, Trost ME, Barros CSL, Pereira DB et al. (2008) Surto de pitiose  
317 cutânea em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **28**, 583-587.  
318
- 319 Grooters AM (2003) Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *The*  
320 *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, **33**, 695-720.  
321

- 322 Grooters AM, Hodgins EC, Bauer RW, Detrisac CJ, Znajda NR et al. (2003) Clinicopathologic  
323 findings associated with *Lagenidium* sp. infection in 6 dogs: Initial description of an  
324 emerging oomycosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **17**, 637-646.  
325
- 326 Hurst RW, Judkins A, Bolger W, Chu A, Loevner LA (2001) Mycotic aneurysm and cerebral  
327 infarction resulting from fungal sinusitis: Imaging and pathologic correlation.  
328 *American Journal of Neuroradiology*, **22**, 858-863.  
329
- 330 Imwidthaya P (1994) Human pythiosis in Thailand. *Postgraduate Medicine Journal*, **70**, 558-  
331 560.  
332
- 333 Junqueira LC, Carneiro J (2013) *Histologia Básica – Texto e Atlas*. Guanabara Koogan, Rio  
334 de Janeiro, pp. 199-216.  
335
- 336 Martins TB, Kommers GD, Trost ME, Inkelmann MA, Figuera RA et al. (2012) A  
337 comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in  
338 horses, dogs and cattle. *Journal of Comparative Pathology*, **146**, 122-131.  
339
- 340 Mendoza L, Hernandez F, Ajello L (1993) Life cycle of the human and animal oomycete  
341 pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**, 2967-2973.  
342
- 343 Miller RI, Campbell RSF (1984) The comparative pathology of equine cutaneous  
344 phycomycosis. *Veterinary Pathology*, **21**, 325-332.  
345

- 346 Miller RI (1985) Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. *Journal of the American*  
347 *Veterinary Medical Association*, **186**, 473-478.
- 348
- 349 Rakich PM, Grooters AM, Tang K (2005) Gastrointestinal pythiosis in two cats. *Journal of*  
350 *Veterinary Diagnostic Investigation*, **17**, 262-269.
- 351
- 352 Reanpang T, Orrapin S, Orrapin S, Arworn S, Kattipatanapong T (2015) Vascular pythiosis of  
353 the lower extremity in Northern Thailand: Ten years' experience. *The International*  
354 *Journal of Lower Extremity Wounds*, **14**, 245-250.
- 355
- 356 Ravishankar JP, Christopher MD, Diana JD, Erin MD, Stephanie DM et al. (2001) Mechanics  
357 of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. *Fungal*  
358 *Genetics and Biology*, **34**, 167-175.
- 359
- 360 Rech RR, Graça DL, Barros CSL (2004) Pitiose em um cão: Relato de caso e diagnósticos  
361 diferenciais. *Clínica Veterinária*, **50**, 68-72.
- 362
- 363 Rodrigues A, Graça DL, Fontoura C, Cavalheiro AS, Henzel A et al. (2006) Intestinal dog  
364 pythiosis in Brazil. *Journal de Mycologie Médicale*, **16**, 37-41.
- 365
- 366 Sathapatayavongs B, Leelachaikul P, Prachaktam R, Atichartakarn V, Sriphojanart S et al.  
367 (1989) Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome.  
368 *The Journal of Infectious Disease*, **159**, 274-280.
- 369

- 370 Shmalberg J, Moyle PS, Craft WC & Walton SA (2020) Severe meningoencephalitis  
371 secondary to calvarial invasion of *Lagenidium giganteum* forma *caninum* in a dog.  
372 *Open Veterinary Journal*, **10**, 31-38.
- 373
- 374 Souto EPF, Maia LA, Virgínio JP, Carneiro RS, Kommers GD et al. (2020) Pythiosis in cats  
375 in northeastern Brazil. *Journal de Mycologie Médicale*, **30**, 101005.
- 376
- 377 Tondolo JSM, Loreto ÉS, Ledur PC, Jesus FPK, Silva TM et al. (2017) Chemically induced  
378 disseminated pythiosis in BALB/c mice: A new experimental model for *Pythium*  
379 *insidiosum* infection. *PLOS One*, **12**, 1-13.
- 380
- 381 Trost ME, Gabriel AL, Masuda EK, Figuera RA, Irigoyen LF et al. (2009) Aspectos clínicos,  
382 morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrintestinal canina. *Pesquisa*  
383 *Veterinária Brasileira*, **29**, 673-679.
- 384
- 385 Uzal FA, Plattner BL & Hostetter JM 2016. Alimentary system, p.1-257. In: MG Maxie (Ed),  
386 Jubb, Kennedy and Palmer's, Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 6<sup>a</sup> ed. Elsevier,  
387 St. Louis.
- 388
- 389 Verdi CM, Jesus FPK, Kommers GD, Ledur PC, Azevedo MI et al. (2018) Embryonated  
390 chicken eggs: An experimental model for *Pythium insidiosum* infection. *Mycoses*, **61**,  
391 104-110.
- 392  
393  
394  
395  
396  
397

398  
399

**Table 1**  
**Histomorphological characteristics and angioinvasiveness of canine pythiosis**

Case	Vascular injury						Presence of hyphae											
	Perivasculitis		Vasculitis		Wall				Lumen				Thrombus					
	A	V	L	C	S	C	S	A		V		L		A	V			
	H	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H	G	A	V		
1	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	
2	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
3	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+ <sup>2</sup>	
5 <sup>1</sup>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
6	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
7 <sup>1</sup>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
11	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
12	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	
13 <sup>1</sup>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
18	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+ <sup>2</sup>	

400  
401  
402  
403

A, artery; V, vein; L, lymphatic; C, circumferential; S, segmental; H, (HE; haematoxylin and eosin); G, (GMS; Grocott); +, present; -, absent; 1, fibrinoid necrosis; 2, presence of hyphae in thrombus.

404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420

421  
422  
423

**Table 2**  
**Clinical presentation, location of lesions and inflammation pattern of canine pythiosis**

<i>Case</i>	<i>Clinical presentation</i>	<i>Location</i>	<i>Inflammation pattern<sup>a</sup></i>
1	Cutaneous	Skin	PG
2	Cutaneous	Skin (abdomen, foreskin and penis)	PG / N-E / G
3	Cutaneous	Skin (chest, thorax and forelimb)	PG / G / N-E
4	Cutaneous	Skin, Subcutaneous and adjacent musculature	PG
5	GI	MLN	PG / N-E / G
6	GI	LI (colon and rectum) and mesentery	N-E
7	GI	SI (jejunum), mesentery and pancreas	PG / G
8	GI	MLN	PG / G / N-E
9	GI	LI (colon)	PG / N-E / G
10	GI	SI, mesentery and MLN	PG / G
11	GI	LI (colon) and liver	PG / G / N-E
12	GI	LI (cecum and colon), mesentery and liver	N-E
13	GI / Cutaneous	LI (colon and rectum), mesentery and lip	PG / G / N-E
14	GI	LI (rectum) and mesentery	PG
15	GI	SI (duodenum and jejunum), mesentery, pancreas and MLN	PG / N-E / G
16	GI	Stomach, SI (duodenum) and mesentery	PG
17	GI	Stomach, SI (duodenum), mesentery and pancreas	G / N-E / PG
18	GI	MLN, mesentery and SI (duodenum)	PG / NE

424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442

<sup>a</sup>, inflammatory patterns are in decreasing order of frequency; PG, pyogranulomatous; N-E, necro-eosinophilic; G, granulomatous; GI, gastrointestinal; MLN, mesenteric lymph nodes; LI, large intestine; SI, small intestine.

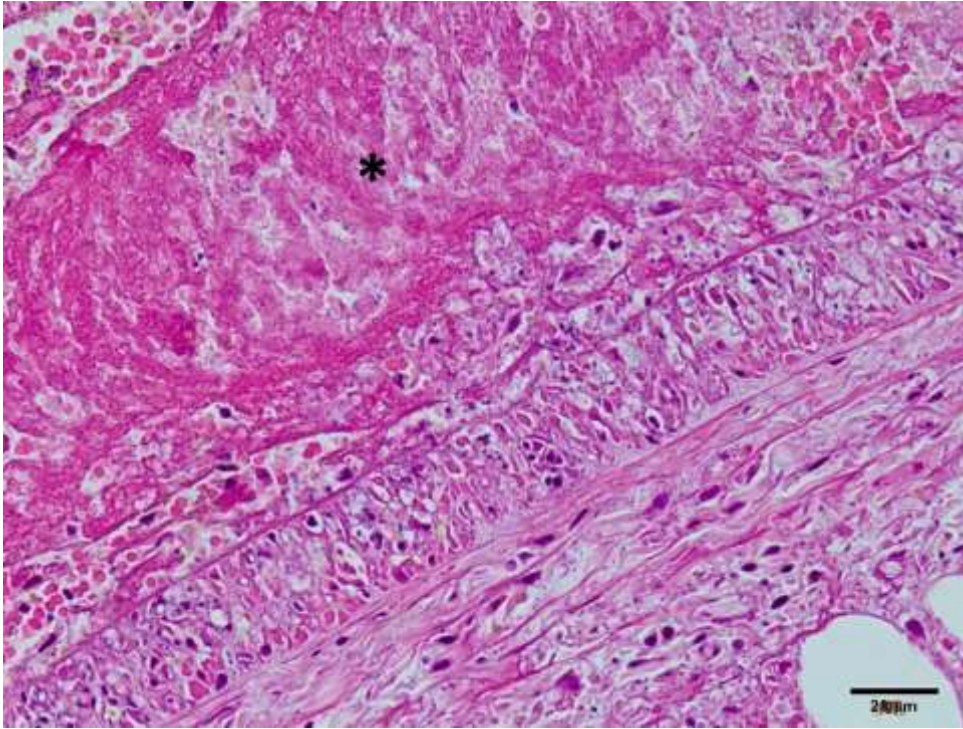


Fig. 1. The formation of fibrin thrombus in an artery (asterisk). Haematoxylin and eosin staining does not reveal hyphae in the vascular wall or lumen (Case 4). HE. Bar, 20μm

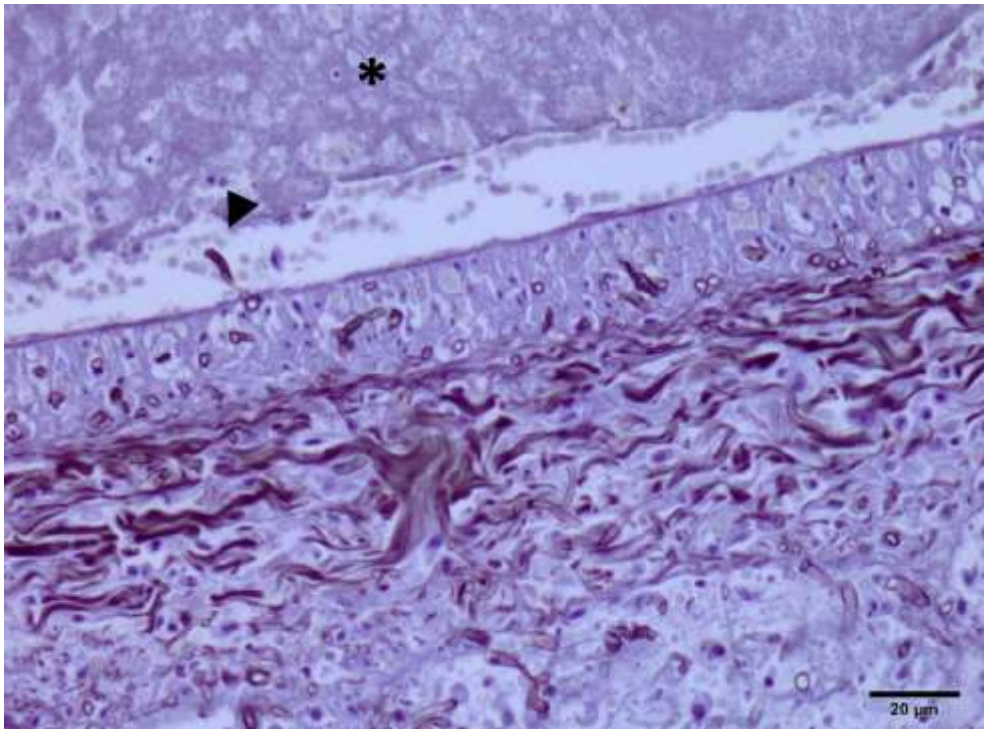


Fig. 2. The same blood vessel as in Fig. 1, with hyphae and collagen fibres in a transversal direction. Note a hyphae, stained with silver in dark brown (arrowhead), entering the vascular lumen, and the formation of fibrin thrombus (asterisk) (Case 4). Modified GMS. Bar, 20μm

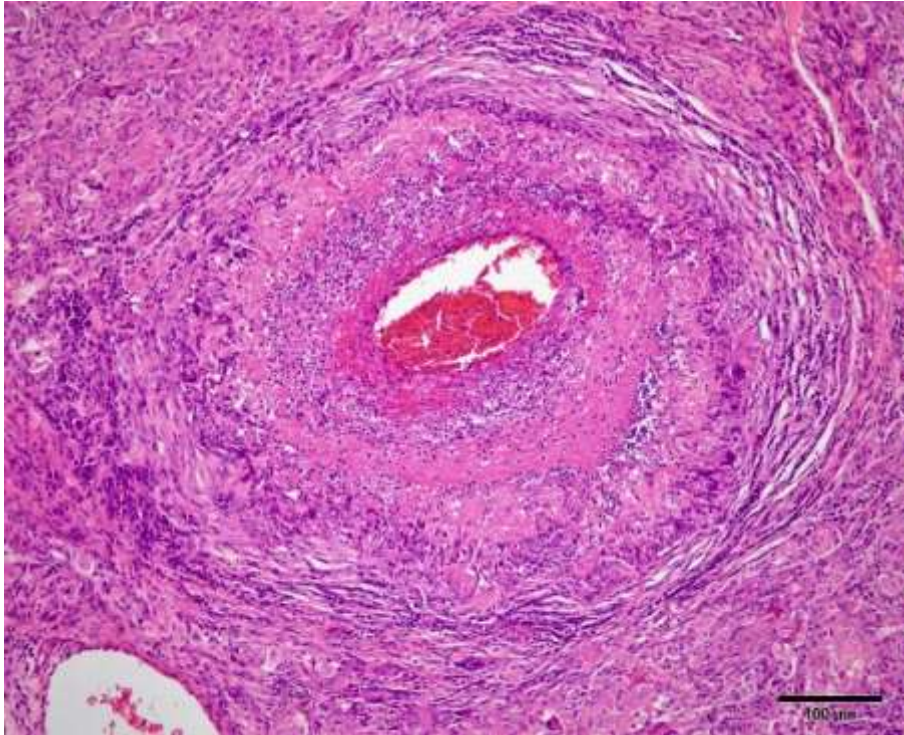


Fig. 3. Circumferential pyogranulomatous arteritis with marked pyogranulomatous inflammation around the affected blood vessel (periarteritis) (Case 7). HE. Bar, 100 $\mu$ m

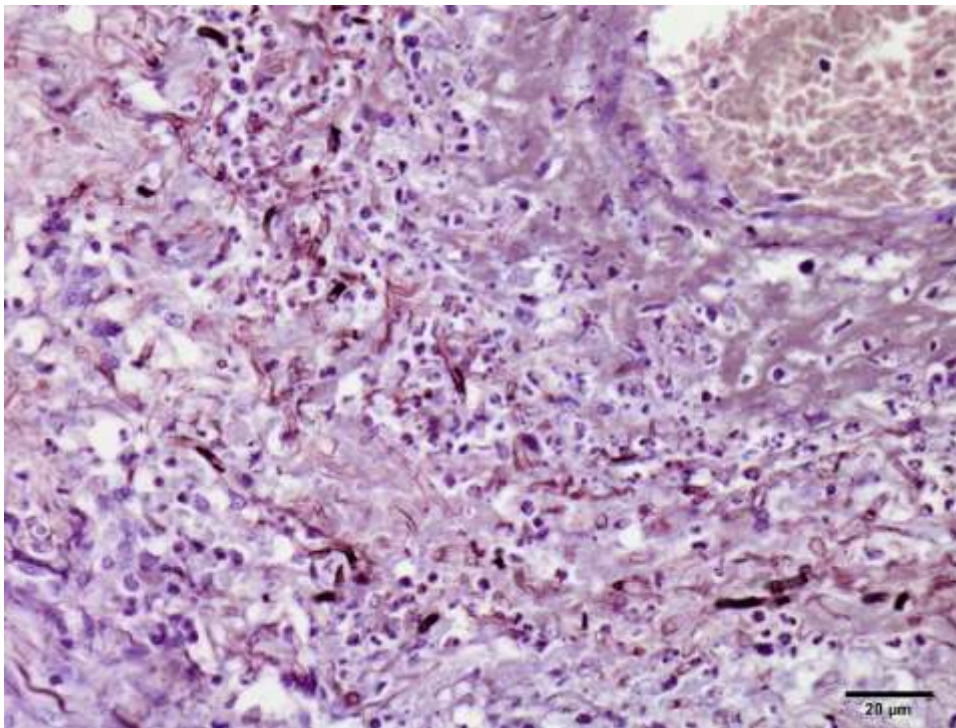


Fig. 4. Note the hyphae stained in dark brown by silver. There is intense perivascular inflammation that spreads to adjacent tissue (perivasculitis) (Case 7). Modified GMS. Bar, 20 $\mu$ m



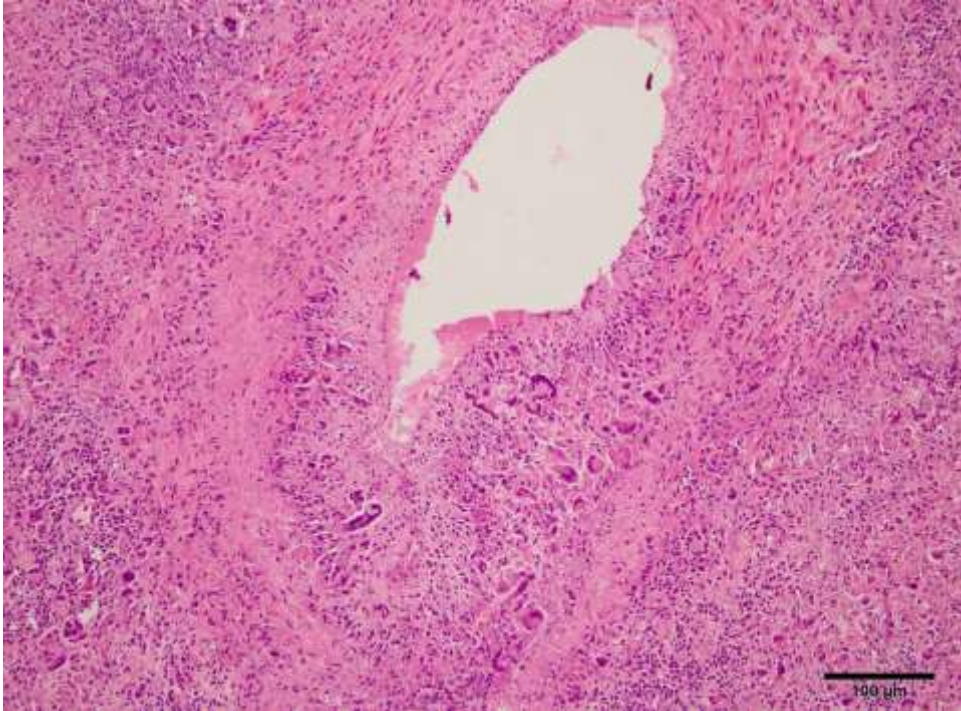


Fig. 5. Artery with segmental granulomatous inflammation (segmental vasculitis). Note how the inflammation extends to the tissue adjacent to the blood vessel wall (Case 11). HE. Bar, 100 $\mu$ m

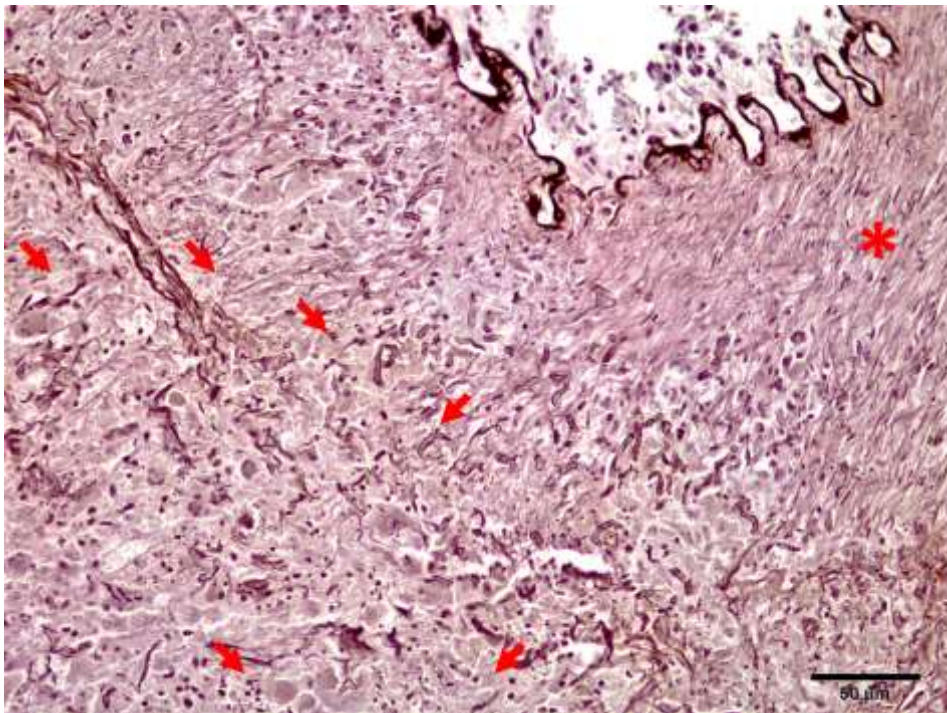


Fig. 6. Artery with segmental arteritis. The hyphae stained in dark brown by silver (arrow red), and inflammation extends from the vascular wall to the perivascular tissue (segmental perivasculitis) by contiguity. Note that there is a focal area of the arterial wall that is still intact (red asterisk) (Case 18). Modified GMS. Bar, 100 $\mu$ m



Fig. 7. The small intestine with diffuse redness of the intestinal wall and mesentery. Note the extensive area of wall rupture (ischaemic necrosis) caused by thrombosis of the jejunal arteries of the mesentery (Case 18)

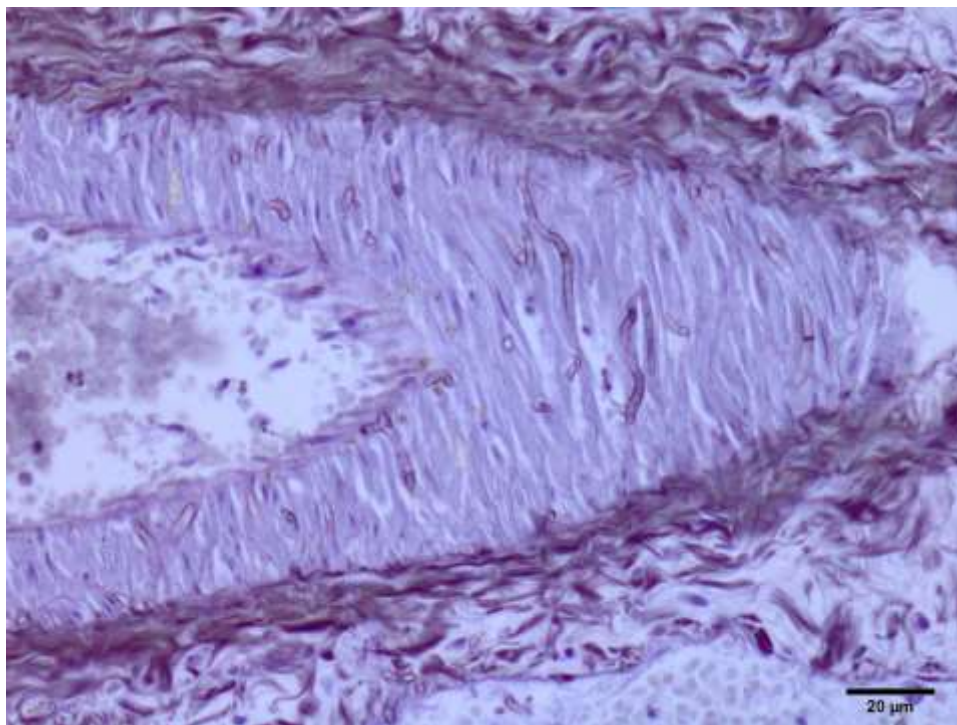


Fig. 8. Numerous hyphae stained in dark brown by silver in a longitudinal direction, parallel to the direction of the fibres of the artery wall (Case 4). Modified GMS. Bar, 20µm

## **4 ARTIGO 2 - ENVOLVIMENTO VASCULAR NA FORMAÇÃO DOS KUNKERS NA PITIOSE EQUIDEA**

Artigo a ser submetido, após tradução, para a revista *Veterinary Dermatology*.

1 **Envolvimento vascular na formação dos kunkers na pitiose**  
2 **equídea**

3

4 **T. M. Silva\***, **E. C. Lamego\***, **M. M. Flores\*\***, **L. F. Irigoyen\*\***, **A. F.**  
5 **M. Dantas\*\*\***, **G. J. N. Galiza\*\*\***, **R. A. Fighera\*\*** and **G. D.**  
6 **Kommers\*\***

7

8 \*Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), \*\*Laboratório de  
9 Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa  
10 Maria (UFSM).

11 \*\*\*Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus Patos, Paraíba, PB,  
12 Brasil.

13 CORRESPONDENCE: G.D. Kommers [glaukommers@yahoo.com]. Laboratório de  
14 Patologia Veterinária (LPV), Departamento de Patologia, Centro de Ciências da  
15 Saúde, UFSM, Av. Roraima nº1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

16

17 **Contexto** - Pitiose é uma doença infecciosa causada pelo oomiceto  
18 *Pythium insidiosum*, que dentre os animais, acomete principalmente  
19 os equinos. A importância das lesões vasculares em humanos é bem  
20 conhecida. Porém, em equinos, a importância dessas lesões não está  
21 bem determinada.

22 **Objetivos** - Com o intuito de descrever as lesões vasculares e de  
23 compreender como os kunkers se formam e se disseminam, foi  
24 realizado este estudo.

25 **Animais** - Foram reavaliados histologicamente 27 casos de pitiose  
26 cutânea e subcutânea, sendo 25 em equinos, um asinino e um muar.

27 **Material e métodos** - Foi avaliada a presença de artérias no interior  
28 dos kunkers, assim como a presença e localização das hifas na  
29 parede dos vasos sanguíneos e nos kunkers. Para uma melhor  
30 visualização das hifas foi empregada a técnica de metenamina-nitrato  
31 de prata de Grocott (modificada).

1 **Resultados** - Foram observadas hifas na parede de artérias e  
2 arteríolas, na periferia dos kunkers e predominando no sentido  
3 longitudinal no interior de fibras colágenas presentes em alguns  
4 kunkers. Na periferia das artérias afetadas havia formação de massas  
5 de eosinófilos degenerados circundando-as, caracterizando  
6 periarterite eosinofílica.

7 **Conclusão e importância clínica** - Estes achados sugerem que as  
8 hifas inicialmente utilizem a parede das artérias para a progressão  
9 local das lesões, e que em seguida se disseminem de forma  
10 centrífuga em direção à periferia dos kunkers, utilizando as fibras  
11 colágenas. Estes achados podem explicar a observação macroscópica  
12 de kunkers ramificados, semelhantes à ramificação de vasos  
13 sanguíneos.

14

## 15 **Introdução**

16

17 Pitiose é uma doença infecciosa causada pelo oomiceto *Pythium*  
18 *insidiosum*, que acomete humanos e diferentes espécies animais. Os  
19 equinos são a espécie animal mais acometida pela pitiose e  
20 desenvolvem lesões cutâneas como sua apresentação clínica mais  
21 comum.<sup>1</sup> As patas e a região abdominal ventral são os locais mais  
22 acometidos.<sup>2</sup> Acredita-se que a presença de lesões prévias na pele  
23 predisponha à fixação dos zoósporos, ao encistamento e à penetração  
24 das hifas nas camadas mais profundas da pele.<sup>3</sup> Em seguida inicia-se  
25 um processo inflamatório exacerbado, estimulado por linfócitos Th2,  
26 que incitarão o recrutamento de eosinófilos (via interleucina-5) e,  
27 conseqüentemente, a abundante desgranulação sobre as hifas.<sup>4</sup> O  
28 acúmulo de eosinófilos íntegros e degenerados forma massas  
29 denominadas kunkers, as quais ocorrem unicamente em equídeos. Os  
30 kunkers têm formato irregular e ramificado, são amarelos e friáveis,  
31 e se localizam no interior de tratos fistulosos.<sup>2</sup> No interior dos

1 kunkers foi descrita a presença de pequenas artérias degeneradas.<sup>5,6</sup>  
2 Geralmente não são observadas hifas no tecido fibrovascular entre os  
3 kunkers, somente no interior deles.<sup>6</sup>

4 Enquanto em humanos está bem estabelecida a forma clínica  
5 vascular, onde as hifas utilizam a parede de artérias para migrar,  
6 desenvolvendo aneurismas, trombos e êmbolos que levam à necrose  
7 isquêmica e amputação de membros,<sup>7,8</sup> em animais, a ocorrência e  
8 importância das lesões vasculares é pouco investigada e  
9 caracterizada. No entanto, lesões vasculares já foram observadas em  
10 equinos<sup>5</sup>, gatos<sup>9</sup> e cães<sup>6,10</sup>.

11 O objetivo deste estudo foi investigar o possível envolvimento  
12 dos vasos sanguíneos na formação dos kunkers e na disseminação  
13 das hifas, com consequente progressão local das lesões  
14 cutâneas/subcutâneas em equídeos.

15

## 16 **Material e Métodos**

17

18 Foram estudados 27 casos de pitiose cutânea e subcutânea,  
19 provenientes de necropsias e biópsias de 25 equinos, um muar e um  
20 asinino, diagnosticados nos Laboratórios de Patologia Veterinária da  
21 Universidade Federal de Santa Maria (23 casos), Brasil e da  
22 Universidade Federal de Campina Grande (4 casos), campus Patos,  
23 Paraíba, Brasil. A etiologia de todos os casos deste estudo foi  
24 previamente confirmada pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ)  
25 para *P. insidiosum*<sup>6,12</sup> utilizando anticorpo policlonal anti-*P. insidiosum*  
26 produzido em coelho.

27 Todas as amostras foram previamente fixadas em formol  
28 tamponado a 10%, processadas rotineiramente para histopatologia e  
29 emblocadas em parafina. Seções seriadas ou semi-seriadas, com 3µm  
30 de espessura, foram cortadas e submetidas à técnica de hematoxilina  
31 e eosina (HE), para reavaliação das lesões, e à técnica de

1 metenamina-nitrato de prata de Grocott (GMS). Tal técnica foi  
2 realizada conforme recomendações do fabricante (kit Grocott,  
3 EasyPath), com modificação da contra-coloração, utilizando-se a  
4 hematoxilina de Harris (por 90 segundos), a fim de facilitar a  
5 visualização e determinar a localização das hifas de *P. insidiosum* no  
6 interior dos kunkers. Foi investigada a presença de vasos sanguíneos  
7 nos kunkers e a distribuição das hifas na parede dos vasos. A  
8 projeção das hifas para a periferia dos kunkers, e a presença destas  
9 nas fibras colágenas remanescentes, também foi investigada.

10

## 11 **Resultados**

12

13 Os kunkers caracterizaram-se macroscopicamente como massas  
14 amarelas, friáveis, com formato irregular ou com aparência tubular,  
15 de diferentes tamanhos, muitas vezes ramificando-se e lembrando a  
16 anatomia de um vaso sanguíneo (Figura 1). Microscopicamente, os  
17 kunkers eram constituídos por eosinófilos íntegros ou degenerados,  
18 circundados por tecido fibrovascular e, raramente, por células  
19 gigantes multinucleadas.

20 Dos 27 casos estudados, foram observadas arteríolas e/ou  
21 artérias íntegras ou degeneradas no interior dos kunkers em 17 casos  
22 pela técnica de HE e em 21 pela técnica de GMS. Em seis casos não  
23 foram observados vasos sanguíneos nos kunkers. Hifas na parede  
24 destes vasos foram observadas em 13 casos pela técnica de HE  
25 (imagens negativas) e em 18 pela técnica de GMS. Foram, por vezes,  
26 observadas hifas que se projetavam levemente em direção ao lúmen  
27 vascular, porém sem formação de trombos. Na periferia destas  
28 artérias, havia formação de massas de eosinófilos degenerados  
29 circundando-as, caracterizando periarterite eosinofílica (Figura 2).

30 As hifas localizavam-se predominantemente na periferia dos  
31 kunkers e, em 24 casos, observavam-se hifas se projetando para fora

1 dos kunkers, em direção centrífuga, conforme a Figura 3. Em alguns  
2 casos era possível observar o tecido fibrovascular adjacente ao  
3 kunker, moldado conforme a morfologia e crescimento do mesmo  
4 (Figura 4). Em alguns casos, foram observadas poucas hifas isoladas  
5 no pequeno espaço claro que separava o kunker do tecido  
6 fibrovascular adjacente (Figura 5). Foram observados também  
7 pequenos grupos de eosinófilos necróticos, com ou sem hifas  
8 intralesionais, próximos ao kunker principal, assemelhando-se a um  
9 kunker em fase inicial de desenvolvimento.

10 Em 24 de 27 casos, foram visualizadas hifas em fibras  
11 colágenas degeneradas (colagenólise) no interior dos kunkers. A  
12 determinação do sentido das hifas foi mais facilmente observada pela  
13 técnica de GMS. As hifas estavam principalmente em sentido  
14 longitudinal (22 casos), isoladas ou em agregados (Figura 6).

15

## 16 **Discussão**

17

18 Os achados macroscópicos, histopatológicos e histoquímicos  
19 permitem sugerir o envolvimento vascular na formação dos kunkers  
20 na pitiose cutânea/subcutânea equídea. As principais evidências são:  
21 a) o formato tubular e ramificado dos kunkers macroscopicamente  
22 (semelhante à ramificação vascular); b) a presença, nos kunkers, de  
23 artérias contendo hifas na parede e a intensa inflamação eosinofílica  
24 periarterial; e c) a presença de hifas somente nos kunkers e  
25 projetando-se nestes de forma centrífuga. Isso permite teorizar que  
26 após infiltrar a derme, as hifas adentram a parede de  
27 artérias/arteríolas como possível mecanismo de migração das hifas  
28 pela parede do vaso atingido, juntamente com a intensa resposta  
29 inflamatória de eosinófilos, formam as concreções tubulares  
30 ramificadas denominadas de kunkers.



1           No interior das lesões de pitiose equina, há concreções/massas  
2 amarelas e friáveis com formatos irregulares, semelhantes a corais  
3 marinhos, denominadas kunkers.<sup>5</sup> Durante a dissecação dos kunkers,  
4 em alguns casos do presente estudo, evidenciou-se que eles  
5 tomavam uma aparência tubular, com ramificações, lembrando vasos  
6 sanguíneos. Essas características provavelmente se tornem mais ou  
7 menos proeminentes, conforme o estágio da doença. Este achado  
8 fortalece a hipótese de que os vasos sanguíneos sejam estruturas  
9 essenciais (como um arcabouço) na formação dos kunkers e na  
10 propagação das hifas (como um caminho) na pitiose cutânea de  
11 equídeos.

12           Microscopicamente, os kunkers são formados por grande  
13 quantidade de eosinófilos (principalmente degenerados) e hifas, e  
14 ficam no interior de tratos fistulosos circundados por tecido  
15 fibrovascular. Assim como observado no presente estudo, na  
16 literatura foi descrita a presença de pequenas artérias degeneradas  
17 no interior dos kunkers,<sup>5</sup> porém, a frequência da presença de hifas,  
18 sua localização e orientação em meio a essas artérias não haviam  
19 sido previamente investigadas até o momento. A maior observação de  
20 artérias pela técnica de GMS, possivelmente se deu pela melhor  
21 observação do arranjo concêntrico das fibras de colágeno dos vasos,  
22 também impregnadas pela prata.

23           A presença de hifas na parede de artérias neste estudo,  
24 fortalece a hipótese de que elas utilizariam a parede dos vasos  
25 sanguíneos para se guiar e migrar localmente, à semelhança do que é  
26 descrito na forma clínica vascular em humanos.<sup>7,8</sup> Em paralelo,  
27 iniciaria-se um processo inflamatório, com o recrutamento abundante  
28 de eosinófilos,<sup>4</sup> visto neste estudo como periarterite eosinofílica em  
29 lesões iniciais. Haveria o aumento progressivo do tamanho  
30 (diâmetro) dos kunkers, em decorrência de as hifas migrarem para a  
31 periferia destes, orientando-se de maneira centrífuga. Esse conjunto

1 de observações explicaria o porquê de alguns kunkers terem formato  
2 de ramificações de vasos sanguíneos, quando dissecados. Foram  
3 ainda observados pequenos kunkers isolados em meio ao tecido  
4 fibrovascular, sem uma aparente continuidade entre si ou com  
5 kunkers maiores, e sem vasos intralesionais aparentes. É possível  
6 que esses kunkers sejam pequenas projeções de kunkers próximos,  
7 que devido ao corte tangencial feito durante o processamento do  
8 tecido e do corte histológico, tenham ficado separados da massa  
9 principal.

10 A ausência de hifas isoladas em meio ao tecido fibrovascular  
11 que circunda os kunkers corrobora com a possibilidade de que os  
12 kunkers tenham ligação entre si (utilizando as artérias e suas  
13 ramificações como arcabouço) e que o seu desenvolvimento não é  
14 aleatório. É possível que as hifas necessitem de estruturas que  
15 contenham colágeno, como a parede dos vasos sanguíneos ou as  
16 fibras colágenas remanescentes do tecido afetado como substrato  
17 metabólico.<sup>5</sup> Esse tropismo por colágeno parece existir para muitos  
18 fungos verdadeiros, o que por exemplo faz com que hifas fúngicas  
19 predominem sempre próximas à membrana de Descemet em equinos  
20 com ceratites micóticas, não sendo encontradas com muita  
21 frequência na câmara anterior do olho, mesmo em casos com  
22 perfuração de córnea.<sup>12</sup>

23 Outro aspecto observado neste estudo é a presença ocasional  
24 de hifas no lúmen de artérias no interior dos kunkers, sem aparente  
25 ocorrência de embolismo para outros órgãos, fato investigado mais  
26 detalhadamente em equinos que haviam sido submetidos à  
27 necropsia. Esta observação vem ao encontro de haver poucos casos  
28 de pitiose equina com lesões distantes ou disseminadas na  
29 literatura.<sup>13</sup> Lesões isquêmicas por oclusão arterial por pitiose em  
30 humanos são frequentemente relatadas.<sup>2,7,8,15</sup> A falta de dados com  
31 relação à ocorrência e às consequências de lesões vasculares em

1 animais com pitiose pode se dar pelo menor uso de exames de  
2 angiografia, que são amplamente utilizados em humanos.<sup>2</sup>

3 Os achados desse estudo sugerem que infecção de artérias seja  
4 um evento importante na formação dos kunkers e na sobrevivência  
5 das hifas em equídeos com pitiose cutânea/subcutânea.

6

### 7 **Agradecimentos**

8 Este trabalho foi apoiado financeiramente pela Coordenação de  
9 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). T. M. Silva foi  
10 bolsista da CAPES. E. C. Lamego foi bolsista da Fundação de Amparo  
11 à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). G. D.  
12 Kommers é bolsista de produtividade em pesquisa do Conselho  
13 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; PQ-1D  
14 #307358/2020-8). Os autores agradecem ao Laboratório de  
15 Pesquisas Micológicas (LAPEMI-UFSM) pelo anticorpo anti-*Pythium*  
16 *insidiosum*.

17

### 18 **Referências**

19 1. Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM. Alimentary system. In: Maxie  
20 MG (Ed), Jubb, Kennedy and Palmer's. *Pathology of Domestic*  
21 *Animals*. 6<sup>a</sup> edition. Sant Louis: Elsevier. 2016; 2,1-257.

22

23 2. Santurio MJ, Alves SH, Pereira DB *et al*. Pitiose: uma micose  
24 emergente. *Acta Sci Vet* 2006, 34: 1-14.

25

26 3. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. Life cycle of the human and  
27 animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J Clin Microbiol* 1993,  
28 31: 2967-2973.

29

- 1 4. Mendoza L, Mandyb W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-  
2 vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in  
3 horses and dogs with pythiosis. *Vaccine* 2003, 21: 2797–2804.  
4
- 5 5. Miller RI, Campbell RSF. The comparative pathology of equine  
6 cutaneous phycomycosis. *Vet Pathol* 1984, 21: 325-332.  
7
- 8 6. Martins TB, Kommers GD, Trost ME *et al.* A comparative study of  
9 the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses,  
10 dogs and cattle. *J Comp Pathol* 2012, 146: 122-131.  
11
- 12 7. Reanpang T, Orrapin S, Orrapin S *et al.* Vascular pythiosis of the  
13 lower extremity in Northern Thailand: Ten years' Experience. *Int J*  
14 *Low Extrem Wounds* 2015, 14: 245-250.  
15
- 16 8. Chitasombata MN, Petchkuma P, Horsirimanontb S, *et al.* Vascular  
17 pythiosis of carotid artery with meningitis and cerebral septic emboli:  
18 A case report and literature review. *Me Mycol Case Rep* 2018; 21: 57-  
19 62.  
20
- 21 9. Rakich PM, Grooters AM, Tang K. Gastrointestinal pythiosis in two  
22 cats. *J Vet Diagn Invest* 2005, 17: 262-269.  
23
- 24 10. Frade MTS, Diniz PVN, Olinda RG *et al.* Pythiosis in dogs in the  
25 semiarid region of Northeast Brazil. *Pesqui Vet Bras* 2017; 37: 485-  
26 490.  
27
- 28 11. Gabriel AL, Kommers GD, Trost ME *et al.* Surto de pitiose cutânea  
29 em bovinos. *Pesqui Vet Bras* 2008; 28: 583-587.  
30

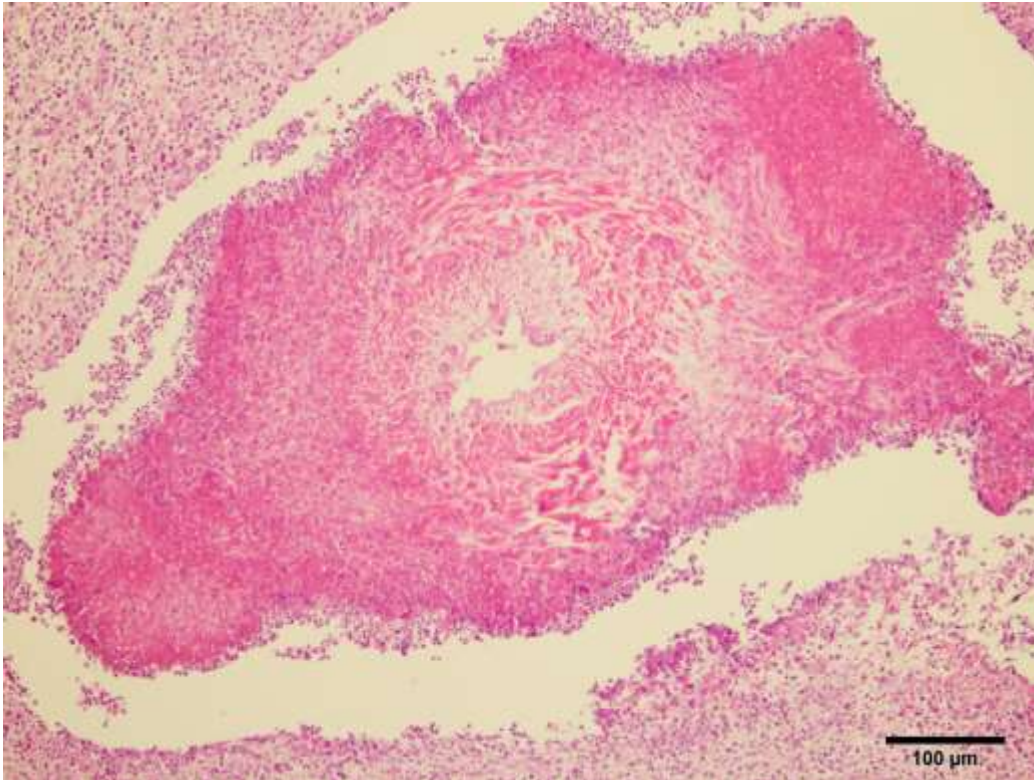
- 1 12. Wilcock BP, Njaa BL. Special senses. In: Maxie MG (Ed), Jubb,  
2 Kennedy and Palmer's. *Pathology of Domestic Animals*. 6<sup>a</sup> edition.  
3 Sant Louis: Elsevier. 2016; 1,407-508.  
4
- 5 13. Reis JL, Carvalho ECQ, Nogueira RHG *et al*. Disseminated  
6 pythiosis in three horses. *Vet Microbiol* 2003, 96: 289-295.  
7
- 8 14. Sathapatayavongs B, Leelachaikul P, Prachaktam R *et al*. Human  
9 pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. *J*  
10 *Infect Dis* 1989, 159: 274-280.  
11
- 12 15. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Pracharktamet R *et al*. Clinical  
13 and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin*  
14 *Infect Dis* 2006, 43: 569-576.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8



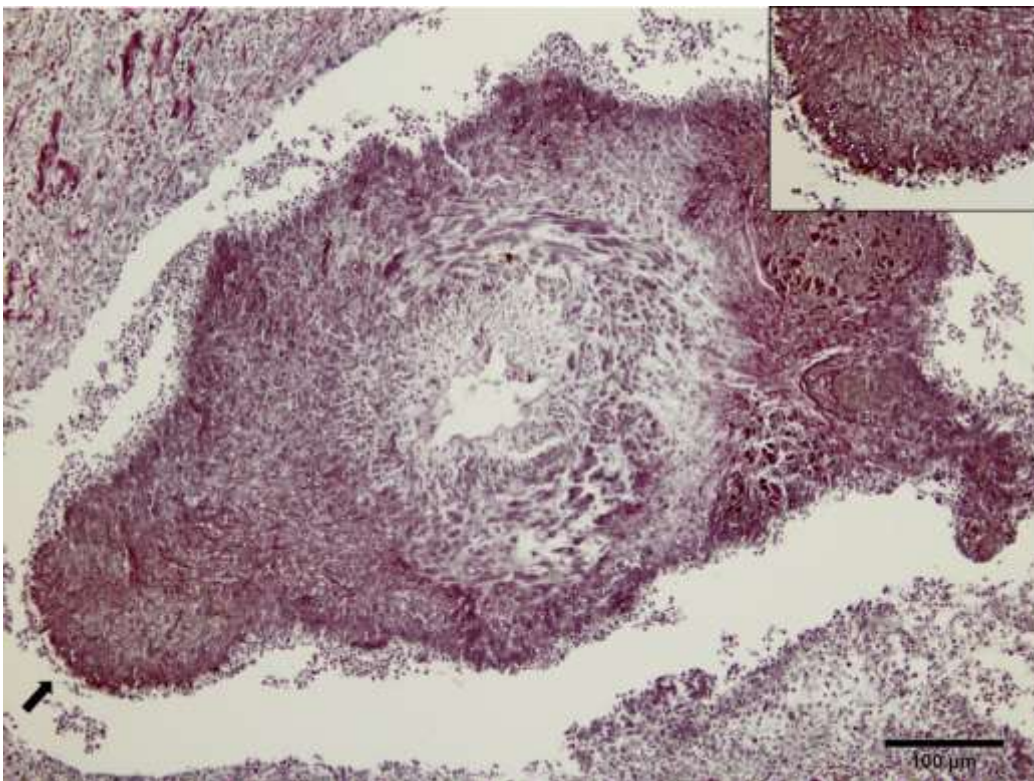
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

**Figura 1.** Krukenberg dissecado com formato tubular e ramificações irregulares, semelhante a um vaso sanguíneo.



1  
2  
3  
4

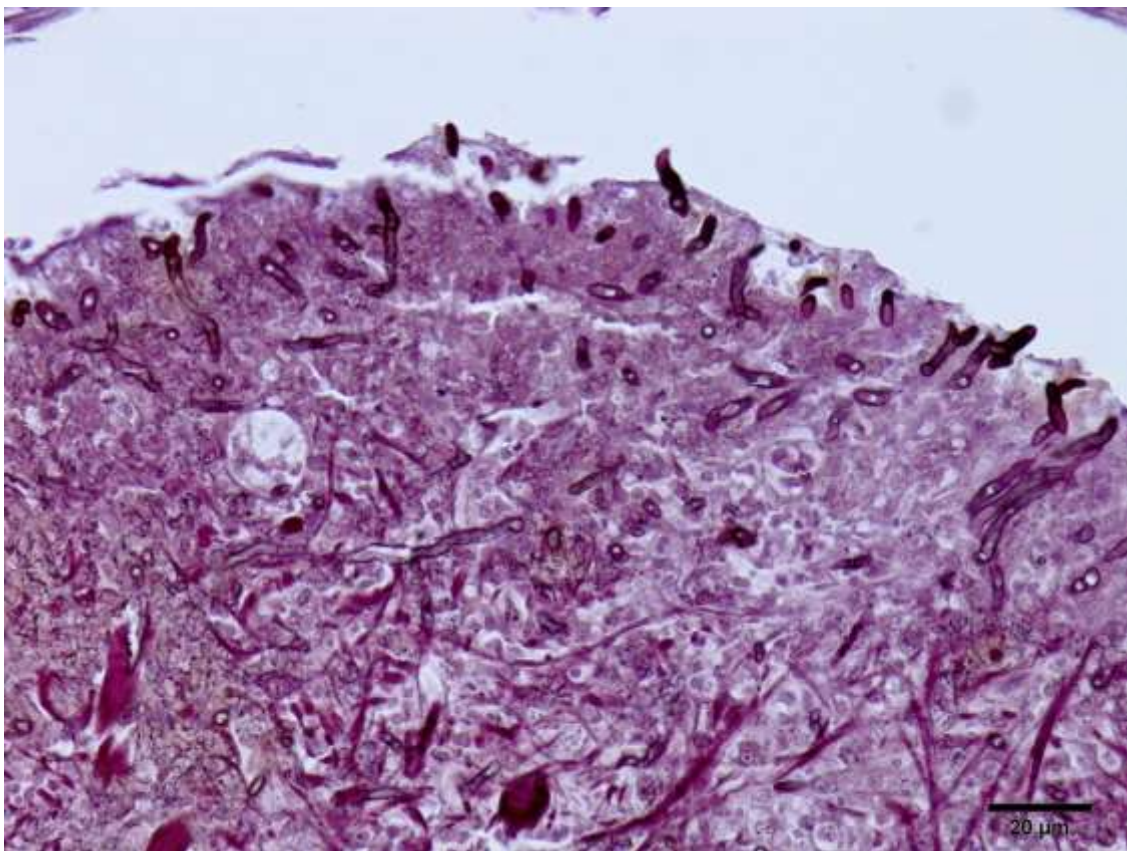
**Figura 2a.** Artéria central de aparência degenerada e acentuada quantidade de eosinófilos degenerados adjacentes à artéria, formando um kunker. HE.



5  
6  
7  
8  
9

**Figura 2b.** Artéria central com formação de kunker adjacente. Na periferia do canto inferior esquerdo do kunker (seta preta) é possível observar numerosas hifas impregnadas pela prata, melhor observadas no detalhe. GMS-modificado.

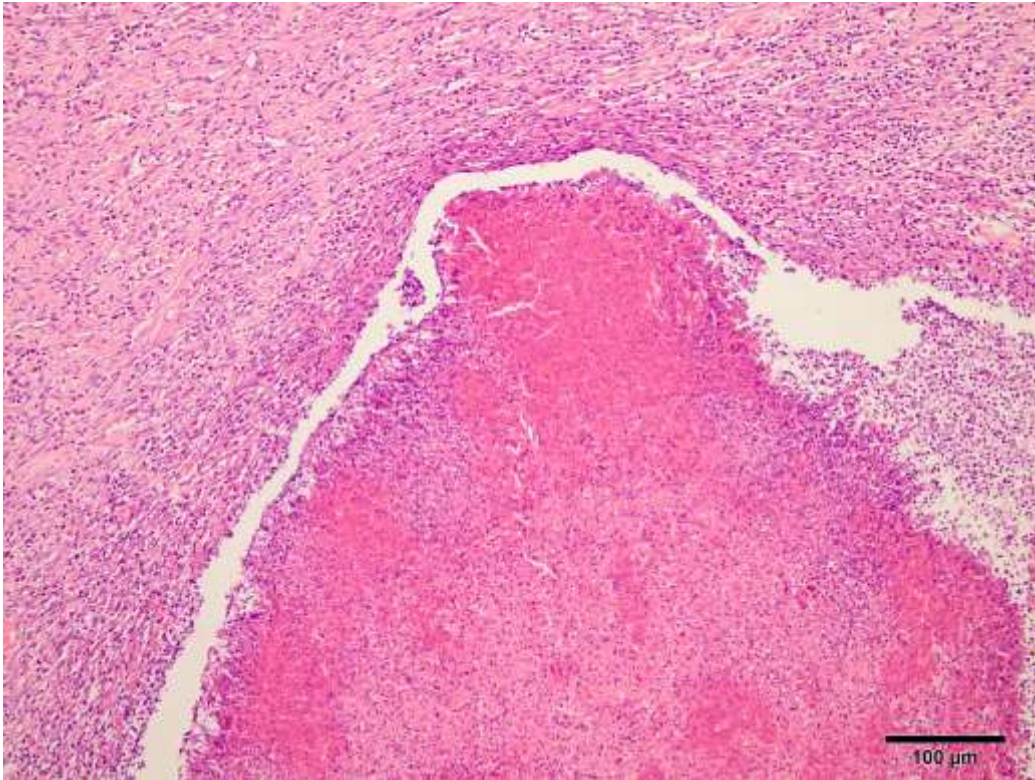
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15



16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

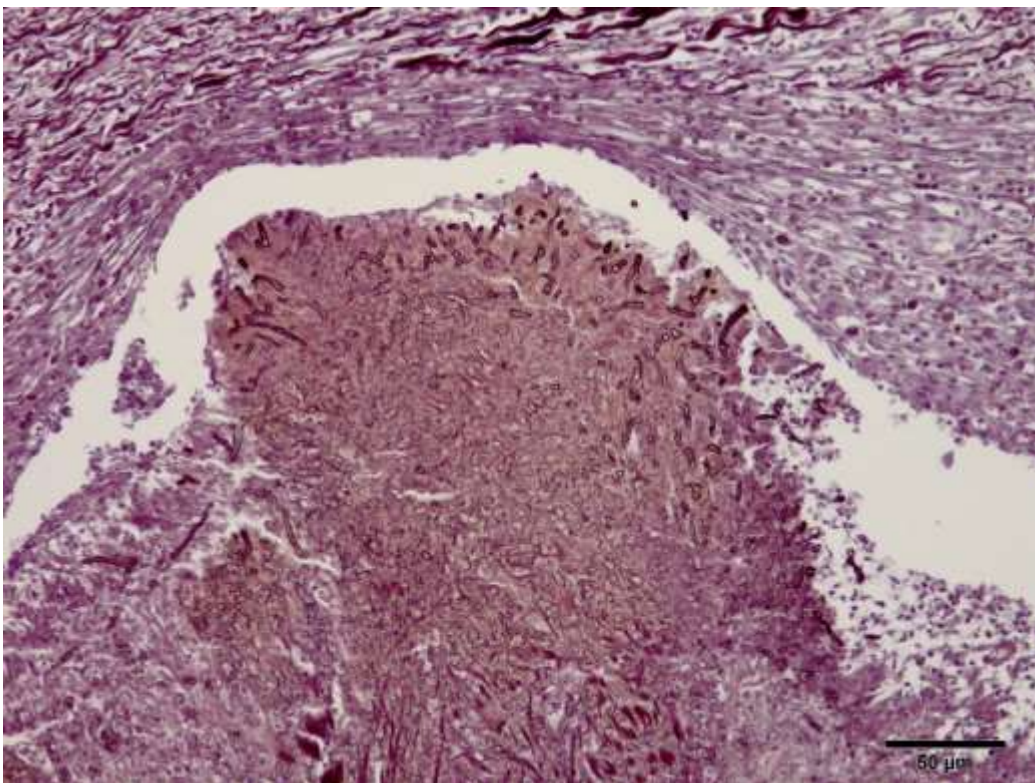
**Figura 3.** Imagem da borda de um kunker com numerosas hifas fortemente impregnadas em preto pela prata de Grocott, sua maioria em sentido longitudinal. Observe as pontas das hifas em direção à porção externa dos kunkers. GMS-modificado.





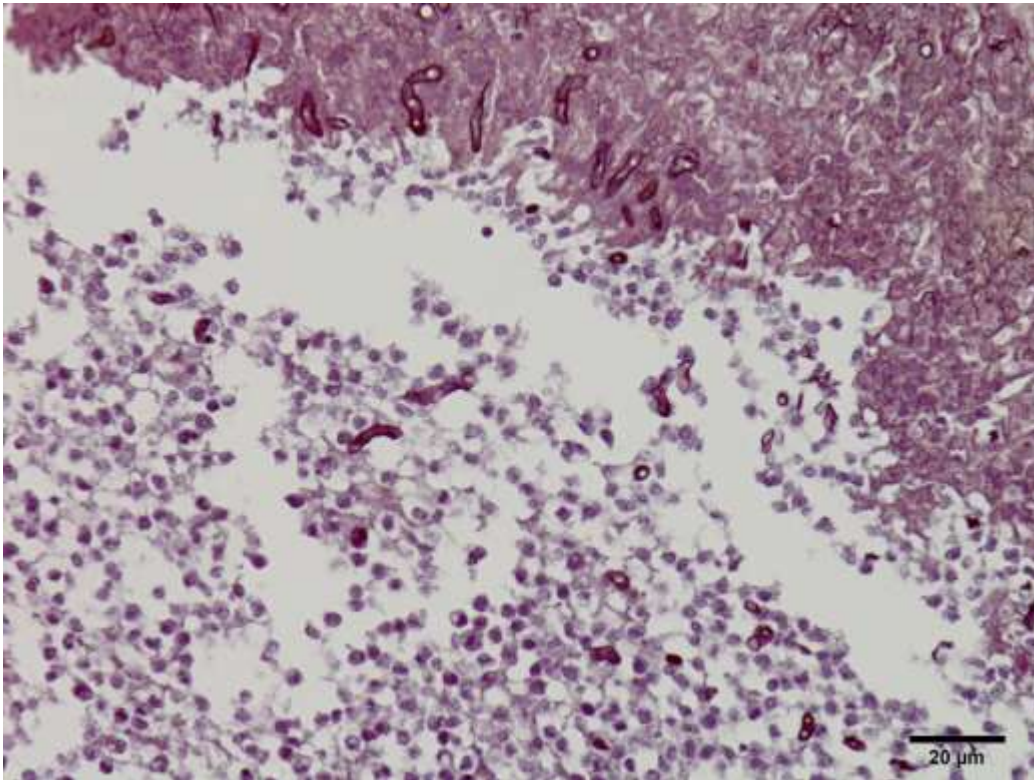
1  
2  
3  
4

**Figura 4a.** Tecido fibrovascular adjacente ao kunker, moldado conforme a morfologia e crescimento do kunker. HE.



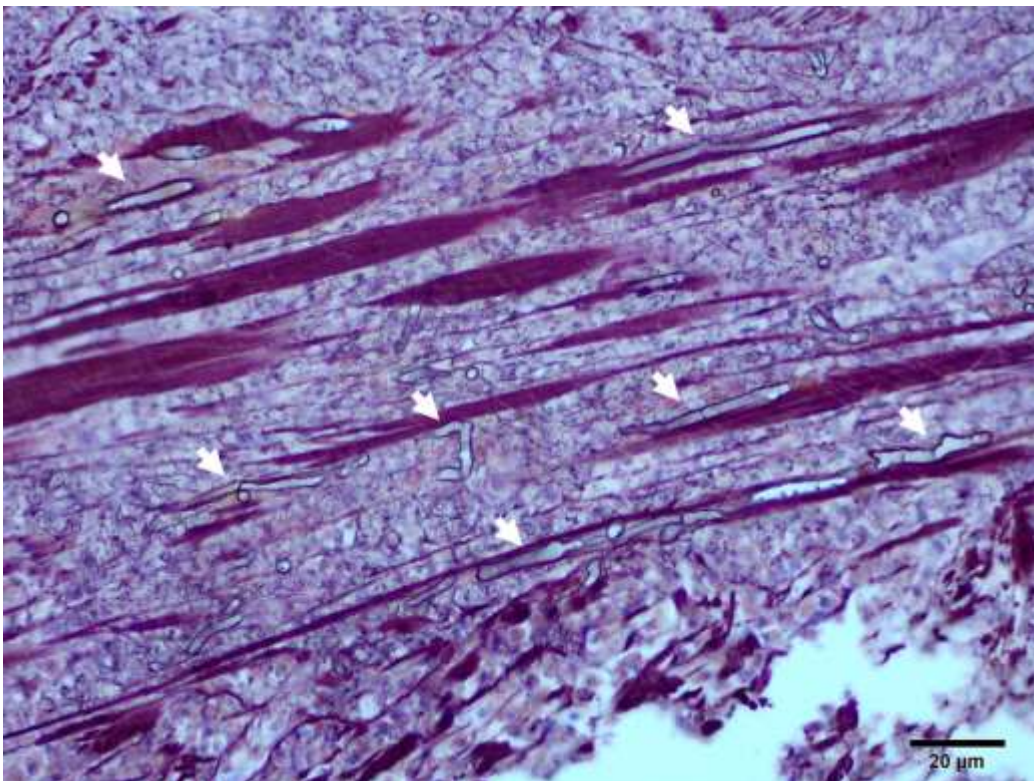
5  
6  
7  
8  
9

**Figura 4b.** Tecido fibrovascular adjacente ao kunker, moldado conforme a morfologia e crescimento do kunker. Observe as hifas na periferia do kunkers impregnadas em preto. GMS-modificado.



1  
2  
3  
4

**Figura 5.** Presença de hifas isoladas no espaço adjacente ao kunkers. GMS-modificada.



5  
6  
7

**Figura 6.** Numerosas hifas no interior de fibras colágenas (setas brancas), a maioria seguindo o sentido das fibras. GMS-modificada.

**5 ARTIGO 3 - SEGMENTAL ENTERITIS ASSOCIATED WITH *PYTHIUM INSIDIOSUM* INFECTION IN A HORSE**

Artigo publicado na *Acta Scientiae Veterinariae*, 2020, Vol. 48 (Suppl 1):570, 01-05.

1        **Segmental Enteritis Associated with *Pythium insidiosum* Infection in a Horse**

2

3        **Taiara Müller da Silva<sup>1</sup>, Mariana Martins Flores<sup>3</sup>, Eryca Ceolin Lamego<sup>1</sup>, Douglas**

4        **Miotto Lorenzetti<sup>1</sup>, Cristina Prade Ramos<sup>2</sup> & Glaucia Denise Kommers<sup>3</sup>**

5

6        Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), <sup>2</sup>Curso de Medicina

7        Veterinária & <sup>3</sup>Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia,

8        Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). CORRESPONDENCE: G.D. Kommers

9        [glaukommers@yahoo.com]. Laboratório de Patologia Veterinária (LPV),

10       Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Av. Roraima n°1000

11       (Prédio 97B), CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

12

## ABSTRACT

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

**Background:** Pythiosis is an infectious disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*, with higher occurrence in wetlands and hot climate regions. This microorganism develops its cycle in aquatic plants, and most cases happen because of the contact of animals or people with water containing the motile zoospores (infectious form). Horses are the principal species affected and develop principally cutaneous and subcutaneous lesions, but the gastrointestinal tract is seldom affected. Humans develop various forms of pythiosis, such as a vascular form. The objectives of the current study are to describe an unusual case of intestinal pythiosis, its clinical signs, aspects of pathogenesis, and diagnosis.

**Case:** A 13-year-old Crioula mare, from Santa Maria, RS, Brazil, presented with reduced food and water intake, apathy, restlessness, rolling, nasal reflux, firm abdomen upon palpation, and tachypnea during 2 days. The horses of this farm were fed native pasture and horse feed, and they had access to a nearby pond. Two days following the start of the clinical signs, the horse died and was necropsied on the farm. During necropsy, there was around 400 ml of reddish effusion in the abdominal cavity (modified transudate). A 15-cm segment of jejunum was firm upon palpation and had a severe transmural thickening. The wall of the affected area was up to 3 cm in thickness and firm, with small yellowish and irregular masses that stood out and looked friable, interpreted as kunkers. Microscopically, the yellowish masses (kunkers) were characterized by dense accumulations of intact and degenerate eosinophils (eosinophilic necrosis). Within these kunkers, and also on their periphery, there were multiple negatively stained hyphal profiles. Hyphae were also seen on the wall of small arteries

1 inside the kunkers. These hyphae had nearly parallel walls and were occasionally  
2 septate, with a diameter of about 10 µm. The hyphae stained black with Grocott's  
3 methenamine silver stain (GMS) and were positive on immunohistochemistry (IHC)  
4 using specific anti-*P. insidiosum* polyclonal antibody.

5 **Discussion:** Colic is the principal clinical presentation in horses suffering from  
6 gastrointestinal tract disorders. In spite of the presence of colic in this horse, intestinal  
7 pythiosis was not clinically suspected in this case, principally because of its rare  
8 occurrence in horses. Even though it is persistent to observe horses ingesting water with  
9 suspected contamination by *P. insidiosum*, the cutaneous form of pythiosis is a lot more  
10 common than the intestinal form. This is the only case of intestinal pythiosis in a horse  
11 in 52 years of routine diagnosis in our laboratory. It is suspected that this horse got  
12 infected by drinking contaminated water from the nearby pond and microlesions in the  
13 intestinal mucosa due to plant material or some unknown pathogen may have favored  
14 zoospore adhesion, encysting and starting the colonization of the tissue by emitting a  
15 germ tube. A macroscopic observation of kunkers in the intestine is rare, but when  
16 observed it is highly indicative of pythiosis. The immunohistochemistry technique using  
17 anti-*P. insidiosum* antibody, in accordance with the literature, validates the diagnosis of  
18 pythiosis. In this case, the presence of hyphae in the blood vessel wall inside the  
19 kunkers propose that this finding may be involved in the spread of the lesion but needs  
20 more detailed studies.

21

22 **Keywords:** intestinal pythiosis, horse, oomycete, hyphae, immunohistochemistry.

23

24

## INTRODUCTION

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

Pythiosis is an infectious disease due to the oomycete *Pythium insidiosum*, with greater occurrence in wetlands as well as hot climate regions. This microorganism develops its cycle in aquatic plants, and most cases happen because of the contact of animals or people with water containing the motile zoospores (infective form) [7]. Horses are the principal species affected and develop principally cutaneous and subcutaneous lesions, because of their natural habit wherein they stay for long periods in ponds or lakes. Despite this, the gastrointestinal tract is seldom affected in horses, which is different in what is seen in the canine species [12]. Probably, the lesion development occurs by contact of motile zoospores with skin or mucous membranes that have prior microlesions [7]. Humans develop different forms of pythiosis, such as a vascular form [10]. The aims of the current study are to describe an unusual case of intestinal pythiosis, including clinical signs, main lesions, aspects of pathogenesis, and diagnosis.

## CASE

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

A 13-year-old Crioula mare, from Santa Maria, RS, Brazil, presented with a reduced food and water intake, apathy, restlessness, rolling, nasal reflux of bloody fluid, firm abdomen upon palpation, and tachypnea. Two days following the beginning of the clinical signs, the horse died and was necropsied on the farm. The horses of this farm were fed with native pasture and horse feed and had access to a nearby pond.

During necropsy, there was around 400 ml of reddish effusion in the abdominal cavity (modified transudate). A 15 cm segment of the jejunum was firm upon palpation and had a severe transmural thickening. The wall of the affected area was up to 3 cm in

1 thickness and firm, with small yellowish and irregular masses that stood out and looked  
2 friable, which are interpreted as kunkers (Figure 1). The mucosa was also ulcerated with  
3 a darkened luminal surface. Adhesion of the mesentery to the serosa of the affected  
4 segment was noted. Prior to the affected area, the duodenal and jejunal segments  
5 demonstrated wall edema and multifocal petechiae on serosa. The entire small intestine  
6 was filled with bloody fluid content.

7 Tissue samples were formalin-fixed and routinely processed for histopathology  
8 in the Laboratório de Patologia Veterinária of the Universidade Federal de Santa Maria  
9 (LPV-UFSM). Microscopically, the yellowish masses (kunkers) were distributed  
10 multifocally within the wall of the affected intestinal segment and were characterized by  
11 dense accumulations of intact as well as degenerate eosinophils (eosinophilic necrosis)  
12 (Figure 2). Within these kunkers, and also on their periphery, there were multiple  
13 negatively stained hyphal profiles. These hyphae had nearly parallel walls and were  
14 occasionally septate, with a diameter of around 10 µm. The hyphae stained black with  
15 Grocott's methenamine silver stain (GMS; histokit Grocott [EP-12-20017])<sup>1</sup> (Figure 3).  
16 Hyphae were also noted on the wall of small degenerate arteries inside of some kunkers  
17 (Figure 4). To confirm the etiology, IHC was conducted using an anti-*P. insidiosum*  
18 polyclonal antibody<sup>1</sup>, according to Gabriel et al. [4], modified by Martins et al. [6]. The  
19 hyphae were positive on IHC (Figure 5). In 52 years (1968–2019), 609 horses have  
20 been necropsied in the LPV-UFSM, and this is the only case of intestinal pythiosis.

21

22

## DISCUSSION

23

24

The gross and histological findings of this case were highly consistent with intestinal pythiosis. The use of hematoxylin and eosin and GMS does not distinguish



1 between *Pythium insidiosum*, *Conidiobolus* spp., and *Basidiobolus* spp. hyphae [11].  
2 Therefore, as in this case, the confirmation of the etiology can be made by IHC using  
3 anti-*P. insidiosum* specific antibody, which has been utilized reliably since 1988 [3] and  
4 is well established by Gabriel et al. [4], Galiza et al. [5], Martins et al. [6], and Ubiali et  
5 al. [11].

6 The mural thickening of the jejunum of this horse developed severe clinical  
7 signs of colic. This clinical syndrome is the principal clinical presentation in horses with  
8 gastrointestinal tract disorders [1,9]. This is the first case of intestinal pythiosis in a  
9 horse at LPV-UFSM in 52 years, making up 0.16% of the cases. Therefore, in spite of  
10 the presence of colic in this horse, intestinal pythiosis was not clinically suspected in  
11 this case. This fact shows that intestinal pythiosis should be included in the list of  
12 differential diagnoses of colic.

13 Intestinal masses in live horses must be clinically differentiated from tumors,  
14 foreign bodies, enteroliths, phytobezoars, impactions, intussusceptions, and severe  
15 intestinal inflammation. When macroscopic evaluation excludes foreign bodies and  
16 enteroliths, circumferential masses in the intestinal wall should be distinguished from  
17 neoplasms (lymphoma, adenocarcinoma) and severe intestinal inflammation.  
18 Histopathological analysis of biopsied masses affecting the intestines can help in the  
19 diagnosis of intestinal pythiosis in live animals. In the case of pythiosis, there may be,  
20 in the middle of these masses, small concretions called kunkers [12], as seen in this  
21 case. Cases wherein the animal was submitted to surgery and recovered from intestinal  
22 pythiosis have also been reported [1,8]. But invariably, in some cases, the injury is so  
23 extensive that the animal must be submitted to euthanasia [9].

1           The cutaneous form of pythiosis is a lot more common than the intestinal form.  
2    Although it is frequent to observe horses drinking suspected contaminated water by *P.*  
3    *insidiosum*, there are a few reports of the latter in the literature [1-3,8,9]. It is suspected  
4    that this horse got infected by drinking contaminated water from the nearby pond;  
5    however, a microbiological evaluation of the water was not performed to validate this  
6    hypothesis.

7           The pathogenesis of intestinal pythiosis lesions is not well understood [2].  
8    However, it is believed that microlesions on the intestinal mucosa due to plant material  
9    or pathogenic agents may favor zoospore adhesion, encystation, and initiation of tissue  
10   colonization via the emission of a germ tube [7]. In this case, it was not possible to  
11   confirm the pre-existence of microlesions, because the intestinal lesions observed  
12   during necropsy were advanced and would have concealed possible pre-existent  
13   abrasions or ulcers. The formation of kunkers in equine pythiosis is classically seen in  
14   skin lesions and seldom reported in the intestines [1]. Inside some kunkers, hyphae were  
15   also seen on the wall of small arteries. This finding proposes a possible role of the  
16   vascular wall in the spread of pythiosis lesions, as noted in humans, in which vascular  
17   lesions facilitate the dissemination of hyphae [10].

18           Colic due to intestinal pythiosis is an uncommon finding in horses. However, it  
19   should be included in the differential diagnosis of this condition. In this case, it was  
20   characterized by the presence of segmental enteritis with kunkers, characteristic  
21   histopathological findings, and etiology confirmation by immunohistochemistry. The  
22   observation of hyphae in the artery wall inside kunkers suggest their involvement in the  
23   pathogenesis; however, it needs further detailed studies.

24

1 MANUFACTURERS

2 <sup>1</sup>EasyPath. Indaiatuba, SP, Brasil.

3

4 **Acknowledgments.** The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de  
5 Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support. T. M. Silva has a  
6 scholarship from CAPES, and E. C. Lamego had a scholarship from the Fundação de  
7 Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). The authors are  
8 grateful to the Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI-UFSM) for the anti-  
9 *Pythium insidiosum* antibody.

10

11 **Declaration of interest.** The authors declare no conflicts of interest. The authors alone  
12 are responsible for the content and writing of this paper.

13

14

#### REFERENCES

15 **1 Allison N. & Gillis J.P. 1990.** Enteric pythiosis in a horse. *Journal of the American*  
16 *Veterinary Medical Association.* 196: 462-464.

17 **2 Bezerra Júnior P.S., Pedroso P.M.O., Pavarini S.P., Dalto A.G.C., Santurio J.M.**  
18 **& Driemeier D. 2010.** Equine intestinal pythiosis in Southern Brazil. *Arquivo*  
19 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 62: 481-483. DOI: 10.1590/S0102-  
20 09352010000200031.

21 **3 Brown C.C. & Roberts E.D. 1988.** Intestinal pythiosis in a horse. *Australian*  
22 *Veterinary Journal.* 65: 88-89.

23 **4 Gabriel A.L., Kommers G.D., Trost M.E., Barros C.S.L., Pereira D.B.,**  
24 **Schwendler S.E. & Santurio J.M. 2008.** Surto de pitiose cutânea em bovinos.

- 1 *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28: 583-587. DOI: 10.1590/S0100-  
2 736X2008001200003.
- 3 **5 Galiza G.J.N., Tochetto C., Rosa F.B., Panziera W., Silva T.M., Caprioli R.A. &**  
4 **Kommers G.D. 2014.** Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de  
5 aspergilose e zigomicose em animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34: 637-642.  
6 DOI: 10.1590/S0100-736X2014000700005.
- 7 **6 Martins T.B., Kommers G.D., Trost M.E., Inkelmann M.A., Figuera R.A. &**  
8 **Schild A.L. 2012.** A Comparative Study of the Histopathology and  
9 Immunohistochemistry of Pythiosis in Horses, Dogs and Cattle. *Journal Comparative*  
10 *Pathology*. 146: 122-131. DOI: 10.1016/j.jcpa.2011.06.006.
- 11 **7 Mendoza L., Hernandez F. & Ajello L. 1993.** Life Cycle of the Human and Animal  
12 Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 2967-  
13 2973.
- 14 **8 Morton L.D., Morton D.G., Baker G.J. & Gelberg H.B. 1991.** Chronic  
15 Eosinophilic Enteritis Attributed to *Pythium* sp. in a Horse. *Veterinary Pathology*. 28:  
16 542-544.
- 17 **9 Purcell K.L., Johnson P.J., Kreeger J.M., Wilson D.A., 1994.** Jejunal obstruction  
18 caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. *Journal of the American*  
19 *Veterinary Medical Association*. 205: 237-239.
- 20 **10 Reanpang T., Orrapin S., Orrapin S., Arworn S., Kattipatanapong T., Srisuwan**  
21 **T., Vanittanakom N., Lekawanvijit S.P. & Rerkasem K. 2015.** Vascular Pythiosis of  
22 the Lower Extremity in Northern Thailand: Ten Years' Experience. *The International*  
23 *Journal of Lower Extremity Wounds*. 14: 245-250. DOI: 10.1177/1534734615599652.

- 1 **11 Ubiali D.G, Cruz R.A.S., De Paula D.A.J., Silva M.C., Mendonça F.S., Dutra V.,**  
2 **Nakazato L., Colodel E.M. & Pescador C.A. 2013.** Pathology of nasal infection  
3 caused by  
4 *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. *Journal of Comparative*  
5 *Pathology* 149: 137-145. DOI: 10.1016/j.jcpa.2012.12.002.
- 6 **12 Uzal, F.A., Plattner B.L. & Hostetter J.M. 2016.** Alimentary System. In: Maxie  
7 M.G. (Ed). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th edn. St.  
8 Louis: Elsevier, pp.1-257.

9

10

*Received, 23 July, 2020*

11

*Accepted, 4 November, 2020*

12

*Published, 29 November, 2020*

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

## 1 **Figure legends**

2

3 Figure 1. Cutting surface with thickening of the wall and multiple yellowish masses  
4 near the mucosa (black arrows) and wall edema (white arrow). Ulceration of the  
5 intestinal mucosa (arrow head) is observed. Figure 2. Approximate image of a kunker  
6 (asterisk) showing a dense focus with large numbers of intact and degenerate  
7 eosinophils with eosinophil granules (eosinophilic necrosis). Adjacent to the kunker, an  
8 abundant granulation tissue [hematoxylin and eosin; bar = 50  $\mu\text{m}$ ] was seen. Figure 3.  
9 Hyphae impregnated in black by silver (arrows) are noted in the peripheral region of a  
10 kunker [GMS; bar = 10  $\mu\text{m}$ ]. Figure 4. Hyphae impregnated in black (arrows) by silver  
11 in the artery wall inside kunkers [GMS]; bar = 10  $\mu\text{m}$ ]. Figure 5. A hyphae  
12 immunolabelled (arrow) for polyclonal anti-*Pythium insidiosum* antibody by  
13 immunohistochemical staining [IHC; bar = 10  $\mu\text{m}$ ].

14

15

16

17

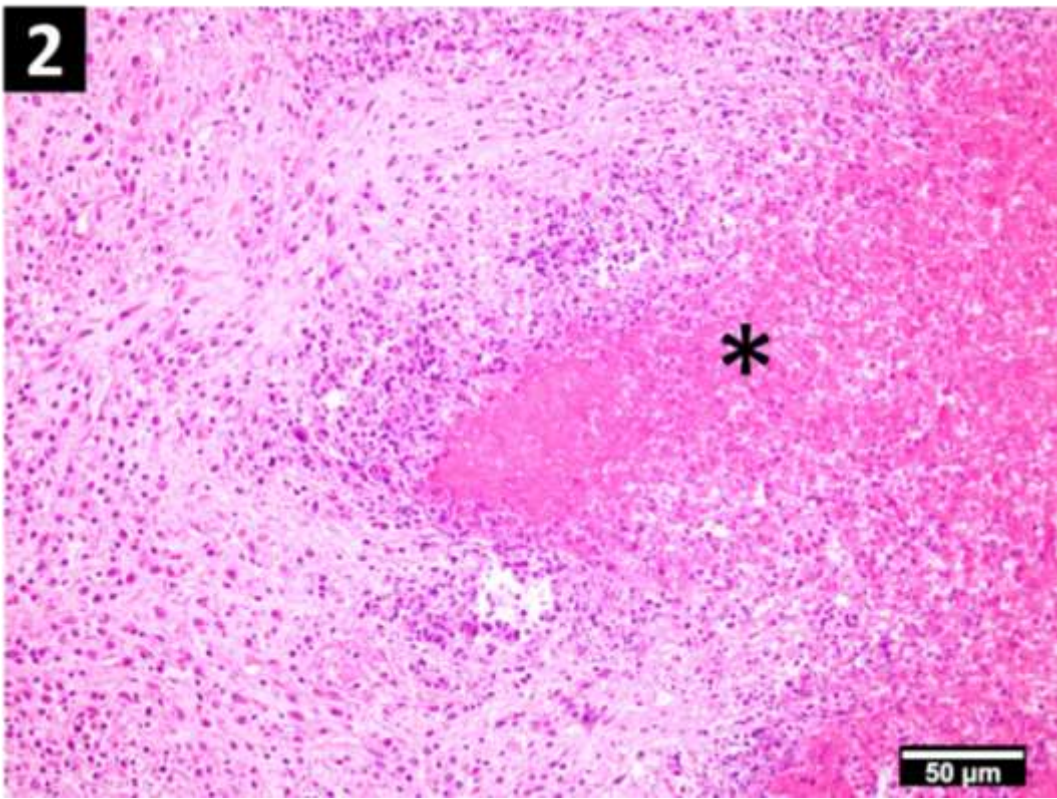
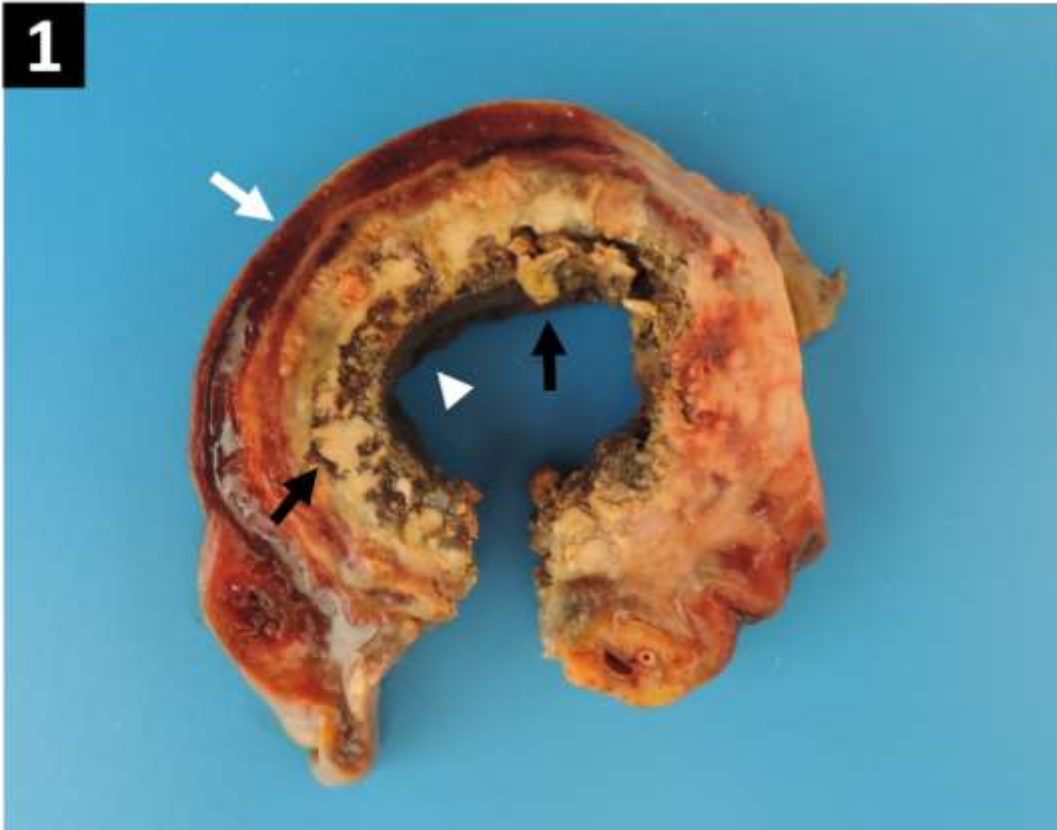
18

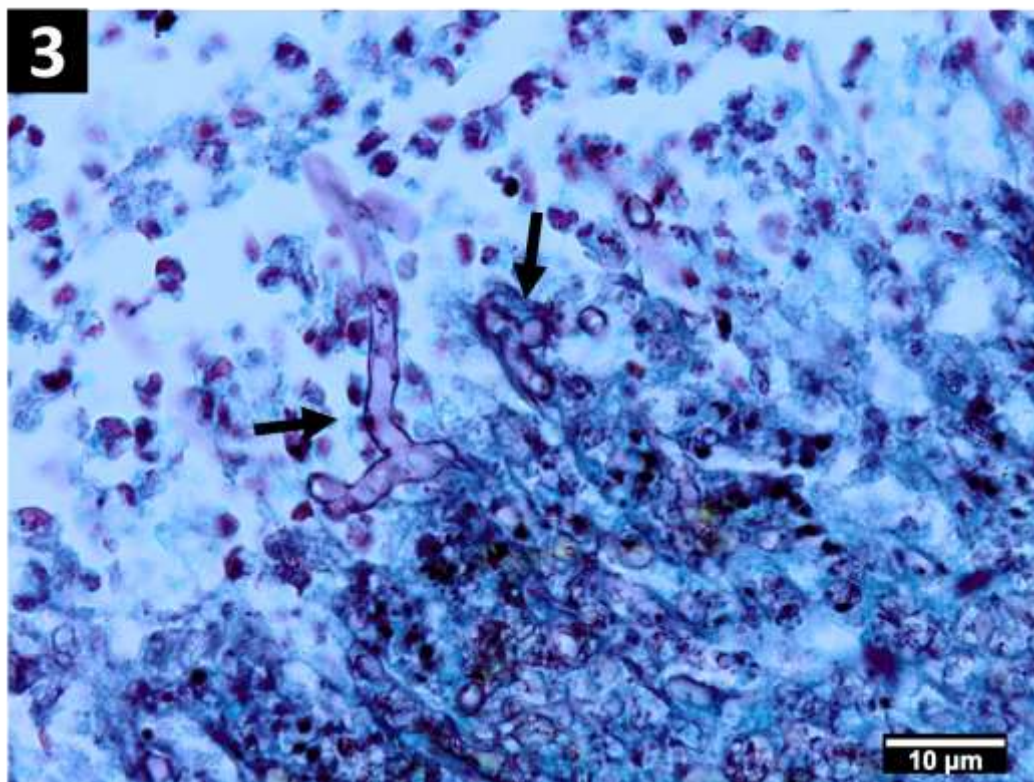
19

20

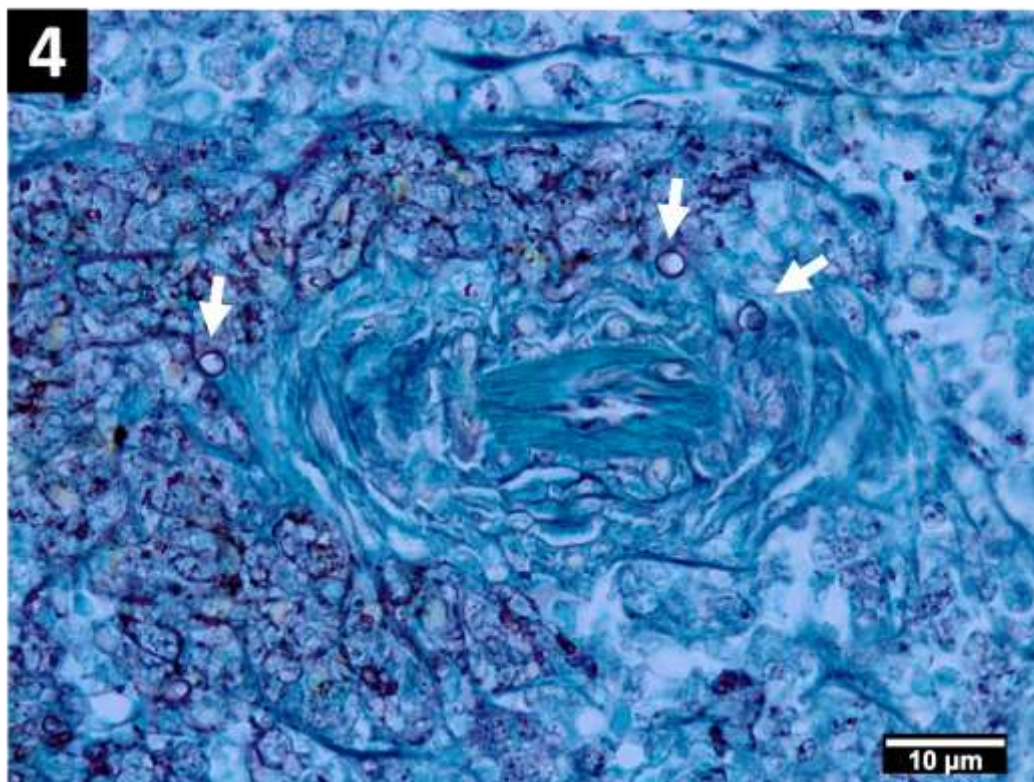
21

22



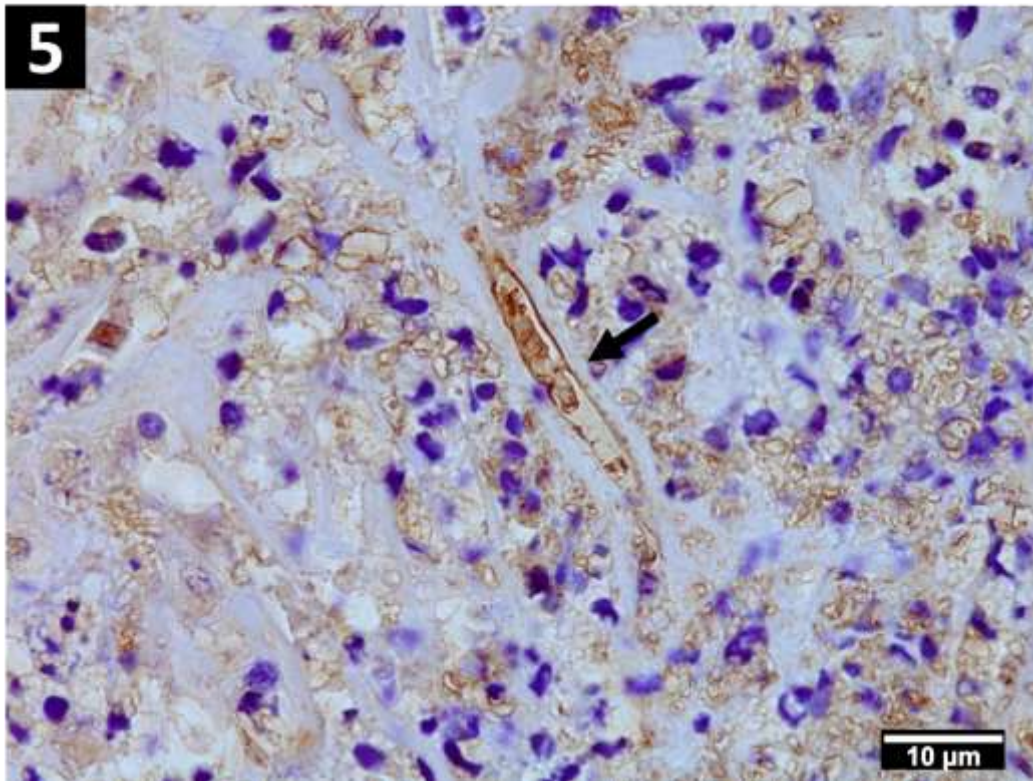


1  
2



3





1

2

## 6 DISCUSSÃO

Mediante a revisão dos casos de pitiose canina e equídea desta tese, pode-se caracterizar as lesões vasculares e inferir como as lesões de pitiose evoluem e se disseminam, comparativamente a pitiose humana, resguardadas as diferenças entre as espécies acometidas. A avaliação deste conjunto de casos permitiu a compilação de três artigos científicos (Artigos 1, 2 e 3).

Em todos os três artigos observaram-se lesões e/ou hifas na parede de vasos sanguíneos. A técnica de GMS modificada facilitou a observação das hifas intraesionais, ao mesmo tempo que permitiu determinar a localização das mesmas nos tecidos, devido à contra-coloração com hematoxilina de Harris. Assim, depreende-se que essa contra-coloração pode ser amplamente utilizada na rotina diagnóstica. A atribuição das lesões vasculares na patogênese e a compreensão das formas de disseminação da pitiose em animais domésticos são pouco exploradas, em contrapartida aos humanos, onde a forma vascular da pitiose é bem conhecida e descrita (CHITASOMBAT et al., 2018; REANPANG et al., 2015; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989). Na literatura veterinária, são citadas lesões vasculares em cães (FRADE et al., 2017; MARTINS et al., 2012; MILLER, 1985), equinos (MILLER; CAMPBELL, 1984), gatos (RAKICH et al., 2005) e em modelos experimentais utilizando camundongos (TONDOLO et al., 2017) e embriões de pintos (VERDI et al., 2018). Além disso, lesões vasculares na lagenidiose, outra doença causada por oomiceto, também foram relatadas (SHMALBERG et al., 2020).

Nos 18 casos de pitiose estudados em cães no Artigo 1, foi frequente a observação de lesões vasculares, caracterizadas por reação inflamatória na parede, na camada mais externa dos vasos sanguíneos e adjacente aos mesmos (perivasculite), sendo esta circunferencial ou segmentar, semelhante ao descrito na lagenidiose (SHMALBERG et al., 2020). Características semelhantes foram observadas no Artigo 2, que abrangeu 27 casos de pitiose equídea, no qual foram observados kunkers com artérias e arteríolas centrais e presença de hifas na parede. No artigo 2, as hifas apresentaram crescimento centrífugo, com inflamação perivascular eosinofílica e formação dos kunkers. Com base nestas características, sugeriu-se que as hifas utilizam a parede vascular tanto em cães como em equídeos, semelhante ao observado em

humanos (REANPANG et al., 2015; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989), como um arcabouço e um caminho, a partir do qual se disseminam para o próprio tecido e estruturas contíguas pela extensão (contiguidade) do processo inflamatório. Em humanos, com a forma vascular da pitiose, foram visualizadas hifas na margem cirúrgica proximal e aparentemente íntegra de artérias acometidas (REANPANG et al., 2015; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989). Nos equinos do Artigo 2, semelhante ao observado na literatura (MARTINS et al., 2012), não foram observadas hifas no tecido fibrovascular que circunda os kunkers. Estas características reforçam a hipótese de que as hifas utilizam a parede de vasos sanguíneos como uma importante via de disseminação. Possivelmente a maior utilização de artérias pelas hifas seria pela utilização do colágeno da parede vascular. Comparativamente, em infecções por *Aspergillus fumigatus*, já foi comprovada a atividade da elastase sobre a elastina como importante fator na patogênese da aspergilose (BLANCO et al., 2002), sendo que tal componente é um importante constituinte da parede de alguns vasos sanguíneos e do tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Uma hipótese para a invasão tecidual por *P. insidiosum* seria a ação da ponta dos tubos germinativos e das hifas, semelhantemente a ponta de uma agulha, exercendo força mecânica sobre os tecidos, que, somado a ação de enzimas, facilitariam o crescimento invasivo e colonização tecidual (GAASTRA et al., 2010; RAVISHANKAR et al., 2001). No Artigo 2, foi possível observar numerosas pontas de hifas (observadas em sentido longitudinal) formando projeções na periferia dos kunkers, além de estarem presentes no interior de fibras colágenas. Uma característica interessante observada neste estudo foi a observação do tecido fibrovascular que permeia os kunkers sendo moldados pelo kunker, por vezes, dando a impressão do tecido sendo empurrado pelos kunkers. Além disso, hifas foram observadas isoladas no espaço adjacente aos kunkers, com neutrófilos e principalmente eosinófilos, fortalecendo a teoria de que as hifas utilizam a parede das artérias e que em seguida, em sentido centrífugo, vão na direção da periferia dos kunkers, para expansão dos mesmos.

Tanto nos cães quanto nos equídeos aqui estudados, na maioria dos casos, foram observadas hifas na parede de artérias e menos comumente no lúmen dos vasos sanguíneos ou em trombos, desfavorecendo a ocorrência de embolismo, como forma principal de disseminação das lesões em cães e equídeos, ao contrário do que é

observado em infecções fúngicas e na pitiose vascular em humanos (CHITASOMBAT et al., 2018; HURST et al., 2001; KRAJAEJUN et al., 2006) e na lagenidiose (SHMALBERG et al., 2020). Já em estudos experimentais inoculando zoósporos de *P. insidiosum* em camundongos (TONDOLO et al., 2017) e em embriões de pintos (VERDI et al., 2018), observaram-se hifas na parede, no lúmen vascular e formação de trombos, com provável disseminação embólica para órgãos (nos camundongos). Estes fatos apontam para a marcada diferença entre as espécies na patogênese da pitiose. Em um dos casos do Artigo 1, foram observados trombos na raiz mesentérica que provavelmente levaram à isquemia, com necrose e ruptura de porções adjacentes do intestino. É possível que o mecanismo nesse caso seja o mesmo descrito por VERDI et al. (2018) e SHMALBERG et al. (2020), onde os trombos impediram a oxigenação e troca de nutrientes (isquemia). Em humanos, o desenvolvimento de trombos e aneurismas em artérias provoca consequências graves como necrose e amputação principalmente de membros inferiores (IMWIDTHAYA, 1994; REANPANG et al., 2015).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto na pitiose canina quanto na pitiose equídea foram observadas lesões vasculares, possibilitando assim inferir que as hifas utilizam a parede dos vasos sanguíneos como importante via de disseminação. A parede vascular seria um arcabouço e, a reação inflamatória adjacente a esses vasos, permitiria que as lesões, juntamente com as hifas, se propagassem por extensão (contiguidade). A observação de hifas principalmente na parede de artérias e, em menor quantidade no lúmen vascular ou em meio a trombos, desfavorecem a possibilidade de disseminação do agente por embolismo, possivelmente, explicando a escassez de casos com lesões disseminadas.

Na pitiose equina o formato macroscópico tubular e ramificado dos kunkers se assemelha à ramificação de vasos sanguíneos. A presença de artérias contendo hifas na parede e a intensa inflamação eosinofílica periarterial, formando as concreções denominadas kunkers, além da presença de hifas somente nos kunkers e projetando-se de forma centrífuga, fortalecem a hipótese de que as hifas utilizam os vasos sanguíneos como um arcabouço e se disseminam por extensão (contiguidade).

Pitiose intestinal é uma forma clínica incomum em equinos e deve ser incluída como um diagnóstico diferencial para casos de cólica em equinos. Neste caso, também foram observadas lesões vasculares e hifas na parede de vasos sanguíneos no interior dos kunkers.

Tais características demonstram as importantes diferenças entre as espécies afetadas pela pitiose, e reforçam ainda mais a necessidade de estudos comparativos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BUERGELT, C.; POWE, J.; WHITE, T. Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 2, p. 186-189, 2006.

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

DELONE, D. R. et al. Disseminated aspergillosis involving the brain: distribution and imaging characteristics. **American Journal of Neuroradiology**, v. 20, p. 1597-1604, out. 1999.

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

LUMSDEN, R. D. et al. Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. **Phytopathology**, v. 66, p.1203-1209, 1976.

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.

MIAUX Y. et al. MR of cerebral aspergillosis in patients who have had bone marrow transplantation. **American Journal of Neuroradiology**, v. 16, p. 555-562, mar. 1995.

MOISER, D. A. Vascular Disorders and Thrombosis. In: ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 6th. Ed. St. Louis: Elsevier, 2017.

NORLINAH, M. I.; NGOW, H. A.; HAMIDON, B. B. Angioinvasive cerebral aspergillosis presenting as acute ischaemic stroke in a patient with diabetes mellitus. **Singapore Medical Journal**, v. 48, n. 1, p. e1-e4, 2007.

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

PESSOA, C. R. M. et al. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, p.1133-1136, 2012.

SOUTO, E. P. F. et al. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 3, p. 1081-1084, 2019.

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

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

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