

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

**Carine Eloise Prestes Zimmermann**

**MINOCICLINA E IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DA PITIOSE  
EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Santa Maria, RS  
2020

**Carine Eloise Prestes Zimmermann**

**MINOCICLINA E IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DA PITIOSE  
EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS  
2020

ZIMMERMANN, CARINE ELOISE PRESTES  
MINOCICLINA E IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DA PITIOSE  
EXPERIMENTAL EM COELHOS / CARINE ELOISE PRESTES  
ZIMMERMANN.- 2020.  
82 p.; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio Santurio  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2020

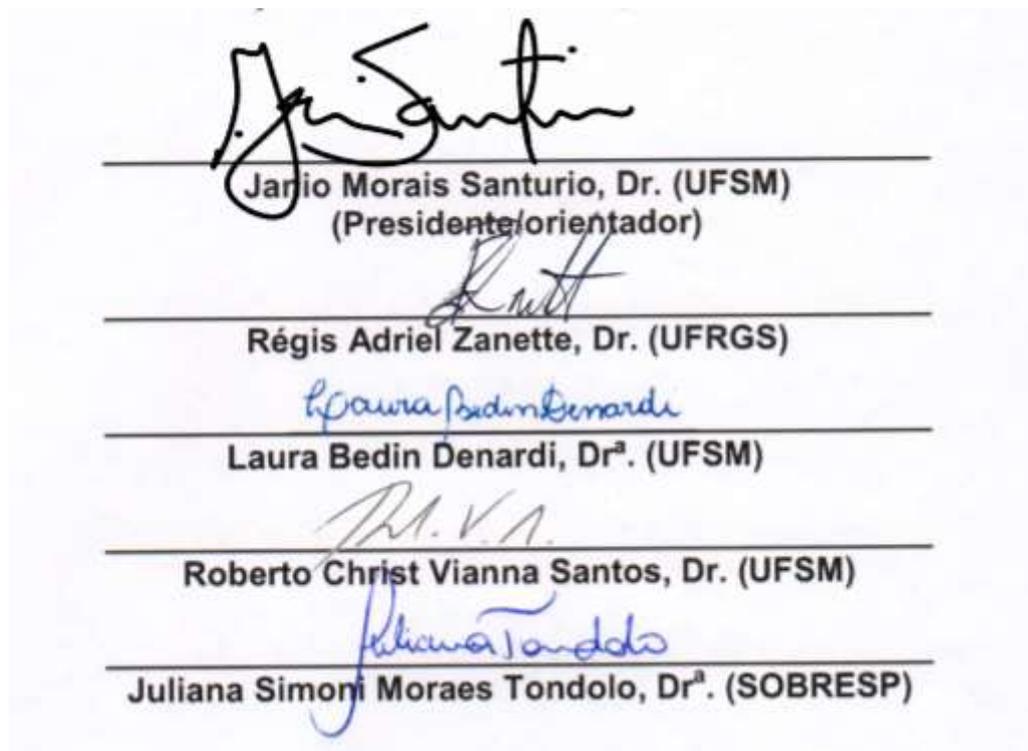
1. Pythium insidiosum 2. Minociclina 3. Imunoterapia  
4. Plaquetas 5. Sistema Purinérgico I. Santurio, Prof.  
Dr. Janio Morais Santurio II. Título.

**Carine Eloise Prestes Zimmermann**

**MINOCICLINA E IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DA PITIOSE  
EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

**Banca Examinadora:**



Jarjio Morais Santurio, Dr. (UFSM)  
(Presidente/orientador)

Régis Adriel Zanette, Dr. (UFRGS)

Laura Bedin Denardi, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)

Juliana Simoni Moraes Tondolo, Dr<sup>a</sup>. (SOBRESP)

Santa Maria, 31 de Março de 2020.

## DEDICATÓRIA

*Ao Prof. Dr. Janio Santurio, admirável mestre e educador;*

*À Dra. Francielli Kunz de Jesus, pessoa comprometida com a ciência e pela  
qual tenho grande apreço.*

## AGRADECIMENTOS

*Esta tese é fruto de uma caminhada muito importante de minha trajetória de vida; ela se construiu a custo de muita persistência e pensamento positivo, quando tudo parecia estar sem saída. Vivi meus melhores e piores momentos durante essa fase, e tenho a certeza que tudo foi necessário para me tornar a pessoa e profissional que sou hoje, resumo dizendo: “isso me preparou para a vida”!*

*Foi uma etapa onde exigiu muita maturidade, dedicação, disciplina, e muita paciência, onde estavam presentes pessoas fundamentais para a realização deste sonho.*

*Registro aqui meus agradecimentos de forma bem sucinta, já que considero a melhor forma de agradecer, retribuindo com atitudes no decorrer de minha vida.*

*Sou grata à Deus, meus pais, minha irmã e meu namorado, por sempre me darem a força e o apoio necessário na realização de meus sonhos. Aos meus amigos, alunos e colegas da Faculdade Cnec Santo Ângelo por toda compreensão e parceria nos momentos que precisei estudar e me ausentar.*

*Minha eterna gratidão ao Prof. Janio Santurio, pela sua paciência e compreensão em entender a minha rotina de trabalho, e por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por ter sido meu orientador no mestrado e doutorado. Minha admiração ao senhor pela pessoa que és, por sua força de vontade, pelo exemplo de mestre e pesquisador. Se um dia eu alcançar 99% do seu jeito de encantar em sala de aula, serei uma professora completamente realizada!*

*Aos meus colegas do LAPEMI, agradeço a ajuda direta e indireta durante os momentos que precisei em especial à Dra. Francielli Kunz de Jesus, pessoa que estimo muito e que me faltam palavras para agradecer o quanto ela foi importante na concretização deste trabalho.*

*À Universidade Federal de Santa Maria, pela disponibilização da estrutura acadêmica, laboratorial e administrativa.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, aos professores pelas oportunidades e assistência acadêmica; À Zeli, por sempre estar pronta a ajudar, com muita disposição e carinho.*

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir).*

***“Sorte é o que acontece quando a preparação encontra a oportunidade”.***

*(Elmer Letterman)*

## RESUMO

### MINOCICLINA E IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DA PITIOSE EXPERIMENTAL EM COELHOS

AUTORA: Carine Eloise Prestes Zimmermann  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

A pitiose é uma doença crônica causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* que acomete tanto animais quanto humanos. Os principais animais atingidos são os equinos e caninos, gerando um quadro clínico preocupante. Se não identificada e tratada rapidamente, a pitiose pode ser fatal, sendo necessário, portanto, o diagnóstico precoce da doença, ainda no seu estágio inicial, antes que acometa órgãos vitais. O tratamento da pitiose é complexo, devido ao fato do agente não responder bem aos fármacos comumente utilizados em doenças fúngicas, visto que, o oomiceto não possui ergosterol em sua membrana. Assim, alternativas terapêuticas têm sido investigadas, dentre elas a imunoterapia e fármacos antibióticos. Neste contexto o presente estudo avaliou o efeito *in vivo* da minociclina isolada e em combinação com a imunoterapia no tratamento da pitiose experimental em coelhos. Vinte e cinco coelhos com três meses de idade foram inoculados subcutaneamente com zoosporos de *P. insidiosum* e divididos em cinco grupos (n = 5), os quais foram tratados com minociclina (10 mg/kg/ duas vezes ao dia), imunoterapia (34 mg Pitium-Vac<sup>®</sup>) e minociclina associada a imunoterapia; e grupo controle com pitiose (n=5) e sem pitiose (saudável, n=5). Os tratamentos foram iniciados 30 dias após a inoculação, por durante 10 semanas e somente nos animais que haviam desenvolvido a doença. As áreas nodulares subcutâneas das lesões nos grupos infectados foram medidas a cada sete dias, a partir do início do tratamento. Também foi mensurada a atividade de algumas enzimas do sistema purinérgico: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) e ecto-adenosina deaminase (E-ADA) em plaquetas. Quando comparados com o grupo controle, os grupos minociclina, e minociclina mais imunoterapia apresentaram lesões significativamente reduzidas. As análises histopatológicas mostraram a presença de inflamação, macrófagos e eosinófilos. A coloração de Grocott revelou estruturas irregulares semelhantes a hifas que foram ramificadas e ocasionalmente septadas. Já o grupo infectado e não tratado apresentou significativo aumento em relação ao grupo saudável em quanto a hidrólise de ADP e AMP. Os resultados também mostraram que as atividades de E-NTPDase e E-5'-nucleotidase apresentaram-se reduzidas de forma significativa nos grupos tratados com imunoterapia, o que conseqüentemente aumentou a concentração extracelular de ATP, ADP e AMP extracelular. Observou-se reduzida atividade da E-NTPDase e E-5'-nucleotidase nos grupos tratados com imunoterapia, o contrário ocorreu no grupo tratado com minociclina isolada, e já no grupo que recebeu a associação de tratamento (minociclina e imunoterapia) apresentou-se significativamente diminuída. A atividade da E-ADA não se alterou no contexto de infecção com o oomiceto. Os resultados sugerem que a minociclina possui atividade fungistática e que a combinação de minociclina e imunoterapia é mais eficaz do que as terapias individuais testadas. E, os resultados reiteram a hipótese de envolvimento do receptor do sistema purinérgico na modulação da resposta imune também para plaquetas, e que os nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina interagem para a modulação da resposta Th1.

**Palavras-chave:** *Pythium insidiosum*. Minociclina. Imunoterapia. Plaquetas. Sistema Purinérgico.

## ABSTRACT

### MINOCYCLINE AND IMMUNOTHERAPY IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL PITHIOSIS IN RABBITS

AUTHOR: Carine Eloise Prestes Zimmermann

ADVISER: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Pythiosis is a chronic disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum* that affects both animals and humans. The main animals affected are the equines and canines, generating a worrying clinical picture. If not identified and treated rapidly, pythiosis can be fatal, so early diagnosis of the disease is still in its early stages, before it attacks vital organs. Treatment of pythiosis is difficult due to the fact that it does not respond well to drugs commonly used in fungal diseases, since the etiologic agent does not have ergosterol in its membrane. Thus, therapeutic alternatives have been investigated, among them immunotherapy and antibiotic drugs. In this context, the present study evaluated the *in vivo* effect of minocycline alone and in combination with immunotherapy in the treatment of experimental pythiosis in rabbits. Twenty five rabbits, aged three months old and subcutaneously inoculated with *Pythium insidiosum* zoospores were divided into four groups (n=5): treated with minocycline (10 mg/kg/day twice daily), treated with immunotherapy (34 mg subcutaneously every 14 days), treated with minocycline plus immunotherapy, untreated (control group, (n=5) and treated (control healthy, n=5). The treatments were started 30 days after inoculation and continued for 70 days. The subcutaneous nodular injury areas in infected groups were measured every seven days after the beginning of treatment. Only the rabbits that developed lesions were selected for this study. When compared with the control group over 70 days, the minocycline and minocycline plus immunotherapy groups of rabbits with pythiosis showed significantly reduced injuries. The histopathology showed the presence of inflammation, macrophages and eosinophils. Grocott's staining revealed irregular hyphae-like structures that were ramified and occasionally septate. The infected and untreated group differed significantly increased in relation to the healthy group only in the hydrolysis of ADP and AMP. The results both showed that E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities were decreased in the immunotherapy-treated groups, which consequently increased the extracellular concentration of extracellular ATP, ADP and AMP. E-ADA activity did not change in the context of infection with the oomycete. Our results suggest that minocycline has fungistatic activity and that the combination of minocycline and immunotherapy is more effective than the individual therapies tested. And, the results reiterate the hypothesis of purinergic system receptor involvement in the modulation of immune response also for platelets, and that the nucleotides and adenine nucleoside interact for modulation of the Th1 response to occur.

**Key words:** *Pythium insidiosum*. Minocycline. Immunotherapy. Platelets. Purinergic system.

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	Ilustração do ciclo de vida do <i>P. insidiosum</i> e do ambiente ótimo para a reprodução e sobrevivência.....	23
Figura 2	(A) e (B) “Kunkers” de eqüinos. (C) zoósporos de <i>P. insidiosum</i> .....	24
Figura 3	(A) Exame a fresco com hidróxido de potássio (KOH) 10% com presença de hifas septadas. (B) Hifas de <i>P. insidiosum</i> esparsamente septadas em lactofenol azul. (C) Cultivo de dois dias a 37°C de <i>P. Insidiosum</i> em ágar Sabouraud dextrose 2%. (D) Cultivo de dois dias a 35°C de <i>P. Insidiosum</i> em ágar sangue.....	26
Figura 4	Estrutura química da Minociclina.....	30
Figura 5	PITIUM-VAC imunoterápico para tratamento da pitiose desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).....	31
Figura 6	Representação do efeito extracelular da adenosina trifosfato (ATP) e concentrações de adenosina na resposta imunológica durante a pitiose e tratamento com imunoterapia em linfócitos de coelhos.....	33
Figura 7	Componentes da sinalização purinérgica. As ectonucleotidases ENTPDase e CD73 promovem a hidrólise de ATP e a formação de adenosina que ativa os receptores P1. A adenosina pode ser convertida à inosina pela enzima adenosina desaminase ou pode ser recaptada através de transportadores de nucleosídeos (ENTs).....	35

### ARTIGO 1

Figura 1	Mean lesion areas of rabbits experimentally inoculated with <i>P. insidiosum</i> zoospores. Pearson’s linear correlation analyses showed involution lesions in the Min + Imm group and in the Min alone and Imm alone groups during treatment. <i>P</i> -value was calculate based on the comparison the mean lesion areas (between day 0 and day 70) of each treated group with the control group. Min: minocycline; Imm: immunotherapy.....	40
Figura 2	Subcutaneous injury tissue from rabbits inoculated with <i>P. insidiosum</i> that were necropsied after 70 days. A and B tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) to examine the inflammatory responses. The areas of necrosis containing <i>P. insidiosum</i> (▼), featured as a negative control image, surrounded by infiltrating macrophages, lymphocytes, and abundant eosinophils. B areas with caseous necrotic (▼) content, macrophages with vacuolated cytoplasm. C and D Grocott’s stain: quantification of the fungal load and inflammatory responses in the granulomatous tissue of animals infected with <i>P. insidiosum</i> using scoring system of 0 to 4. Scored 0, if no filaments were visible, or of 1 to 4 according quantity present of fungal load: rare, few, moderate and many, respectively). Magnification, x400.....	42

### MANUSCRITO 2

Figura 1	Effect of immunotherapy (Pitium-Vac® - PVAC), minocycline (MIN),	
----------	--	--

and PVAC+MIN on NTPDase (ATP (A) and ADP (B)), 5'nucleotidase (AMP (C)) and E-ADA (D) activities on rabbits platelets. Data are presented as mean  $\pm$  SD. HC = Healthy Control; PC = Pythiosis control; n = 5. Groups that share different letters are statistically different ( $P < 0.01$ ).<sup>\*</sup> No significant difference between groups was observed ( $P > 0.05$ ).....

## LISTA DE TABELA

### ARTIGO 1

Table 1	<i>P</i> -value of lesion areas per week of rabbits experimentally inoculated with <i>P. insidiosum</i> zoospores and that received treatment with minocycline and immunotherapy, and were compared with control group at each time point (i.e., days-week) during 70 days.....	41
---------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina Trifosfato
CD-	Célula dendrítica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E-5`-NT	Ecto-5'-nucleotidase
E-ADA	Ecto-adenosina Desaminase
ELISA	Imunoensaio enzimático
E-NPP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
ENTs	Transportadores de nucleosídeo
E-NTPDase	Ectonucleosídeo trifosfato 5`-difosfohidrolase
H&E	Hematoxilina e eosina
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
Ig-	Imunoglobulina
IL-	Interleucina
KOH	Hidróxido de potássio
mRNA	RNA mensageiro
MMP-	Metaloproteinases da Matriz
P-	Receptores Purinérgicos
PAS	Ácido periódico de Schiff
RNA	Ácido ribonucleico
Th0	Linfócitos T help naïve
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
tRNA	RNA transportador
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>4 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
4.1 <i>Pythium insidiosum</i> .....	20
4.2 PITIOSE .....	22
4.2.1 Epidemiologia .....	22
4.2.2 Diagnóstico.....	24
4.2.3 Tratamento.....	26
4.2.4 Resposta imunológica do hospedeiro.....	32
4.2.5 Sistema purinérgico.....	35
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>388</b>
5.1 ARTIGO 1.....	388
5.2 MANUSCRITO 1.....	44
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 1: Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 2: Comprovante de submissão do Manuscrito 1.....</b>	<b>82</b>

## APRESENTAÇÃO

O presente material consiste numa tese de doutorado que segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) do ano de 2015. A mesma está apresentada na forma de um artigo publicado na Revista *Veterinary Microbiology* (fator de impacto: 2,79) e um manuscrito submetido para *Cell Biochemistry* (fator de impacto: 2,14), relacionados com a “avaliação do tratamento para pitiose experimental em coelhos com minociclina e imunoterapia”.

Os itens INTRODUÇÃO, OBJETIVOS, JUSTIFICATIVA e REFERENCIAL TEÓRICO encontram-se no início dessa tese. As seções MATERIAIS E MÉTODOS e RESULTADOS encontram-se nos ARTIGOS CIENTÍFICOS I e MANUSCRITO I, os quais se apresentam na íntegra desse material e seguem as recomendações das revistas as quais foram enviados. Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO encontradas no final da mesma apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos nesse trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens, INTRODUÇÃO, REFERENCIAL TEÓRICO e DISCUSSÃO desta tese, uma vez que as referências utilizadas nos artigos científicos estão ao final de cada um deles.

## 1 INTRODUÇÃO

A pitiose já foi considerada uma doença rara, exótica e restrita a animais de regiões tropicais, ou que se manifestava em humanos somente em áreas endêmicas, como Tailândia, e raramente em outras áreas geográficas (KRAJAEJUN et al., 2006; HILTON et al., 2016). Entretanto nas últimas décadas, a doença desencadeada pelo *Pythium insidiosum* tem aumentado em todos continentes (GAASTRA et al., 2010; VILELA; MENDOZA, 2015; BAGGA et al., 2018).

Pitiose é uma doença crônica, que afeta principalmente equinos e caninos, porém surtos já foram notificados em ovinos, bovinos, felinos, e também, registros de casos em humanos (MARTINS et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; LELIEVRE et al., 2015; HE et al., 2016). A doença é conhecida nos Estados Unidos também como "sanguessugas", "pântano câncer" na Austrália, "bursattee" (ou seja, estação chuvosa) na Índia, "hifomicose destrutiva" no sudeste da Ásia e "mal dos pantanos" no Brasil. Apresenta-se como um tumor cutâneo granulomatoso, ulcerativo, podendo ser letal (SMITH, 1884; SANTOS et al., 2011; GROOTERS, 2003).

É causada pelo oomiceto aquático, *P. insidiosum*, o qual cresce e se desenvolve em áreas com vegetação aquática, através da colonização ou infecção de plantas, desenvolvendo micélios e zoosporângios, os quais liberam zoósporos biflagelados e móveis que nadam e fixam-se ao hospedeiro (MENDOZA; VILELA, 2013; ADHIKARI et al., 2013). As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema, sendo que a produção de zoósporos requer temperaturas entre 30° e 40° C e o acúmulo de água em áreas úmidas, lagoas, e pântanos (MILLER; CAMPBELL, 1982).

Uma pele não íntegra ou até possivelmente pelo folículo piloso (SANTURIO et al., 1998), podem ser o acesso para a invasão do organismo pelo oomiceto, que com a progressão da doença apresenta lesões que se caracterizaram por tumores ulcerados de crescimento rápido, e com abundante tecido de granulação, secreção serossanguinolenta e presença de tratos fistulosos contendo material coraloide ou "kunkers" (em equinos) (PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2019). As principais lesões histológicas consistem de um processo inflamatório piogranulomatoso com numerosos focos de necrose eosinofílica, reação de Splendore-Hoeppli (SANTOS et al., 2010; MARTINS et al., 2012; ÁLVAREZ; VILORIA; AYOLA, 2013).

No Brasil, a doença ocorre predominantemente em equinos (SANTURIO et al., 2008; SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011). A soroprevalência no Rio Grande do Sul, a partir dos registros notificados é estimada em 11,1% (WEIBLEN et al., 2016), já na região semiárida do Brasil chega a 25% (PESSOA et al., 2014), e o Pantanal brasileiro é o que apresenta a maior frequência de pitiose equina no mundo, principalmente nos meses mais chuvosos (entre fevereiro e maio) (SANTURIO et al., 2006; SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011). Dados que são significativos e que acarretam prejuízos agroeconômicos, já que o Brasil possui o maior número de manadas de cavalos da América Latina, classificada em terceiro lugar no mundo (OIE, 2017).

A região sul, incluindo os países vizinhos da fronteira, Uruguai e Argentina, juntos representam cerca de US\$ 7,3 bilhões anual em atividade econômica (IBGE, 2014; MACHADO et al., 2018). Então, ter surtos ou doenças infecciosas nestas áreas é muito preocupante, sendo necessário excluir os riscos, o que é praticamente impossível, e, ou ter controle e vigilância epidêmica. Outra questão relevante é o diagnóstico e o tratamento, já que nem sempre a doença é diagnosticada corretamente e notificada, pois pode ser confundida com habronemose cutânea, mucormicoses, carcinoma de células escamosas, basidiobolomicose e conidiobolomicose, por apresentar semelhanças clínicas e características histológicas (GROOTERS et al., 2002; SANTOS et al., 2011; GROOTERS, 2003). Fato que dificulta a descoberta precoce da doença e o início do tratamento, que já é complexo, e necessita de mais estudos na área para garantir a saúde do hospedeiro, bem como, a eliminação do agente patológico.

Ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos envolvidos na patogênese da pitiose ou na resposta imune dos hospedeiros, devido às características peculiares do agente patogênico (RAMAPPA et al., 2017). Características estas, que o diferencia de fungos verdadeiros, já que, o agente não sintetiza ergosterol na membrana celular, e nem quitina da parede celular, sendo esta, substituída por celulose e  $\beta$ -glucanas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Diante das características mencionadas torna-se complexo compreender o mecanismo exato da ação do agente no organismo infectado, o que dificulta o tratamento de primeira escolha. Além disso, a classificação do *P. insidiosum* já foi reconsiderada, tendo em vista que em 1960 ele foi registrado como um fungo e em

1970, foi reclassificado devido as suas características envolvendo a biossíntese do esterol e parede celular (LERKSUTHIRAT et al., 2017).

O agente causador da pitiose apresenta suscetibilidade variada a antifúngicos (PEREIRA et al., 2007; CAVALHEIRO et al., 2009; JESUS et al., 2015), e são sensíveis a fármacos antibacterianos que inibem a síntese de proteínas, como as tetraciclina (minociclina) e macrolídeos, tigeciclina e oxazolidinonas (linezolida e sutezolida) (LORETO et al. 2014; JESUS et al., 2014; LORETO et al. 2018). Entretanto, a monoterapia com antifúngicos nem sempre apresenta eficácia para o tratamento contra o *P. insidiosum*, fato que instigou a busca por novas opções de tratamento, como a imunoterapia (KRAJAEJUN et al. 2006, PERMPALUNG et al. 2015; SERMSATHANASAWADI et al., 2016).

Em 1981 e 1982 através de Miller, Miller e Campbell foi relatado o uso de antígenos de *P. insidiosum* com potencial terapêutico quando injetados em cavalos. Porém demonstravam taxas de cura acima de 70% e 55% em cavalos e humanos, mas baixas taxas de cura em outros animais (SANTURIO et al., 2003; MENDOZA, MANDY, GLASS, 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005). Então, outros estudos contribuíram para analisar a atividade imunoterapêuticos de preparados a partir de hifas, e foi concluído que apenas o imunoterapêutico macerado era eficaz, levando a uma redução de 71,8% no tamanho da lesão com cura clínica de coelhos (SANTURIO et al., 2003).

O sucesso terapêutico da imunoterapia é justificado a partir da alteração da resposta imune celular a partir dos antígenos imunoterapêuticos que expressam linfócitos T tipo 1 (Th1), produção de IL-2 e interferon- $\gamma$ . E também há mobilização de linfócitos T e macrófagos que destroem as células de *P. insidiosum* (MENDOZA; NEWTON, 2005; BACH et al., 2010). Neste contexto, o presente estudo teve o intuito de investigar um novo tratamento, utilizando a minociclina e imunoterapia em coelhos que experimentalmente foram induzidos a desenvolver a pitiose. Esse trabalho também associou minocilina com o imunoterápico, e analisou a evolução das lesões, bem como, a participação das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-adenosina-desaminase sinalizadoras do sistema purinérgico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito *in vivo* da minociclina isolada e em combinação com a imunoterapia no tratamento da pitiose experimental em coelhos.

### 2.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito *in vivo* da minociclina isolada e em combinação com imunoterapia (Pitium-Vac®) para tratar pitiose experimental em coelhos, através da mensuração do tamanho das lesões subcutâneas e histopatologia.
- Investigar a participação do sistema purinérgico, através da atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-adenosina-desaminase em plaquetas de coelhos inoculados com *P. insidiosum* e tratados com imunoterapia (Pitium-Vac®) e minociclina.

### 3 JUSTIFICATIVA

As falhas às diferentes condutas de tratamento para pitiose resultam em escolhas difíceis para os protocolos terapêuticos da doença. Estes desafios motivam a procura de novas terapias e / ou combinações que sejam satisfatórias. Portanto, novos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de estabelecer tratamentos para a pitiose e que consigam modular a resposta imune do hospedeiro sem causar-lhe prejuízos.

O agente patológico da pitiose, o oomiceto *P. Insidiosum*, apresenta peculiaridades fisiológicas e morfológicas diferentes de um fungo propriamente dito, características que são relevantes e influenciam diretamente no tratamento do hospedeiro, que pode ser o homem ou os animais (equinos, caninos, ovinos, bovinos e felinos). Este oomiceto apresenta diferenças na parede celular e na composição da membrana, o que o distancia taxonomicamente dos fungos verdadeiros. A quitina, um componente essencial da parede celular fúngica, está ausente no *P. insidiosum*, mas ele apresenta como componente predominante a celulose e a  $\beta$ -glucana. Também se difere dos fungos por não apresentar o ergosterol na membrana celular, e utilizar esteróis exógenos.

Estas características citadas dificultam a terapêutica e restringem o arsenal de fármacos que poderiam ser indicados para o tratamento da enfermidade. Diversos protocolos para o tratamento têm sido testados frente a pitiose, entretanto os índices de cura são baixos e muitas vezes questionados cientificamente por não ter uma explicação imunológica adequada. Sendo assim, há necessidade de uma alternativa terapêutica que seja eficiente e não prejudique o hospedeiro. Então, o presente estudo tem relevância científica por tratar de investigar uma associação entre a minociclina e imunoterapia, que já apresentaram excelentes resultados *in vitro* e *in vivo*, porém de forma isoladas.

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 *Pythium insidiosum*

A história deste organismo “tipo fungo” ocorreu por volta de 1901 e sua primeira possível descrição, na pitiose equina, foi por dois investigadores holandeses, entretanto não o identificaram de imediato (PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2019). Os primeiros registros do oomiceto *Pythium insidiosum* ocorreram durante o século XX, por pesquisadores alemães, quando foi isolado de lesões equinas na Indonésia (DE HAAN; HOOBKAMER, 1901). Entretanto, sua classificação só foi realizada décadas depois, em 1974, devido as suas características peculiares, como a produção de zoósporos em meio líquido. Então, foi nomeado como *P. insidiosum* e classificado como um oomiceto pertencente a família Pythiaceae, na ordem Peronosporales (AUSTWICK; COPLAND, 1974).

A classificação taxonômica desse agente foi discutida por vários anos, devido à disposição filogenética complexa (MENDOZA; VILELA, 2013). Foi somente em 1996, que o agente etiológico da pitiose foi classificado como pertencente ao Reino Stramenopila, Classe Oomycetes ou Peronosporomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae (DICK, 2001; GAASTRA et al., 2010). *P. insidiosum* é geneticamente semelhante aos organismos aquáticos, como as algas marrons e diatomáceas, o que o caracteriza como organismo essencialmente aquático (ADHIKARI et al., 2013).

O gênero *Pythium* engloba mais de 250 espécies, consideradas geneticamente diferentes, e que variam quanto à virulência, à distribuição e aos seus hospedeiros (JIANG; TYLER, 2012). Evidências atuais questionam sobre tais características e uma possível reclassificação torna-se iminente, já que, há muitas diferenças moleculares entre isolados analisados no mundo inteiro (RIVIERRE et al., 2005; DE AZEVEDO et al., 2012; SCHURKO et al., 2003).

*P. insidiosum* produz zoosporângios e por isso necessita de temperaturas entre 30° e 40°C. Rompem-se, quando maduros, e liberam zoósporos biflagelados, desenvolvidos de forma assexuada, os quais correspondem à forma infectante do patógeno, capaz de colonizar novos ambientes. Dentre estes, a pele de mamíferos, além dos habitats habituais, como as plantas aquáticas (MENDOZA; VILELA, 2013).

Desta forma, o microrganismo apresenta duas formas: a hifa, caracterizada por ramificação em ângulo reto ou filamentos largos, e o zoósporo, que só se apresenta em ambientes aquáticos (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993).

Quando livres na água, os zoósporos movimentam-se até encontrar outra planta ou animal com tecido não íntegro, ou que facilite sua entrada no organismo, onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a uma nova hifa, que induz o aparecimento das lesões (MILLER, 1983). Santurio et al. (1998) instigam a possibilidade também da penetração dos zoósporos na pele íntegra, a partir do folículo piloso.

*P. insidiosum* microscopicamente desenvolve micélio, assim como, os fungos propriamente ditos. Entretanto, não sintetiza ergosterol na membrana celular e sua parede não contém quitina, sendo composta de celulose e  $\beta$ -glucanas (ALEXOPOULOS et al., 1996). Dessa forma, o oomiceto utiliza esteróis exógenos, sendo uma característica relevante, que os difere dos fungos verdadeiros, e que também reflete na terapia da pitiose (GROOTERS, 2003).

As condições de crescimento do oomiceto favorecem a sua mimetização fora do ambiente aquático, pois ele requer poucos nutrientes para crescer. Assim, de acordo com Gaastra et al. (2010) o desenvolvimento *in vitro* do *P. insidiosum* acontece numa variação de temperatura entre 25° a 45°C. Nessa condição, apresentando colônias hialinas ou as vezes esbranquiçadas, submersas, hifas septadas parcialmente (4 e 10  $\mu$ m de diâmetro), com curto micélio aéreo e padrão delicadamente radiado.

Através da técnica de zoosporogênese, *in vitro*, as condições de desenvolvimento do oomiceto podem ser reproduzidas. Esta técnica consiste na colonização da grama (*Paspalum notatum*), pelo oomiceto em meio de cultura sólido e posterior incubação em solução contendo sais minerais (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2008). Assim, torna-se reprodutível a realização de estudos de suscetibilidade *in vitro*, bem como, a reprodução da doença em modelo experimental (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2007; CAVALHEIRO et al., 2009; JESUS et al., 2015). Já a virulência deste microrganismo, segundo Jiang e Tyler (2012) e Zanette et al. (2013) está associada à famílias de proteínas, incluindo toxinas extracelulares, enzimas hidrolíticas e proteínas efectoras, que podem penetrar no citoplasma do hospedeiro.

## 4.2 PITIOSE

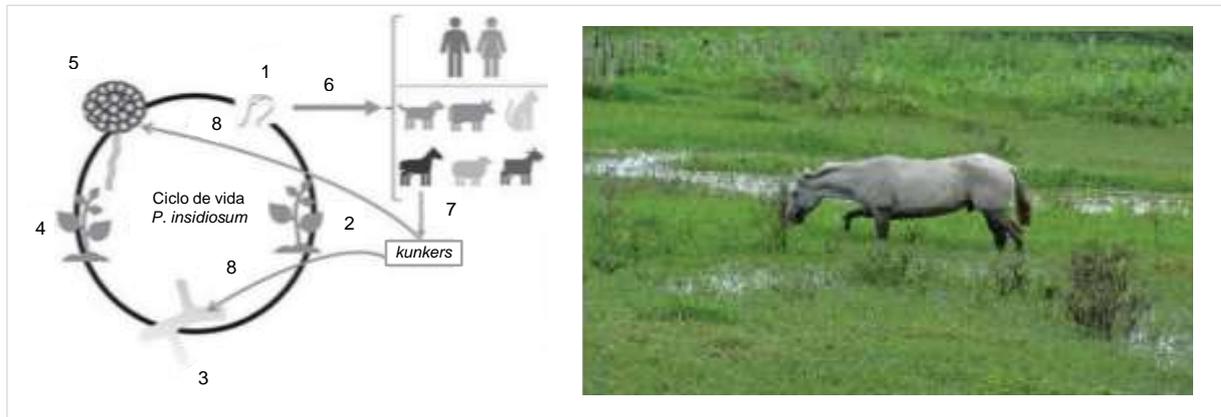
### 4.2.1 Epidemiologia

A pitiose é uma doença granulomatosa crônica, não transmissível, considerada insidiosa, e que pode levar à morte se não tratada (MENDOZA et al., 1996; MENDOZA, 2005). É uma doença multissistêmica que afeta cavalos, bovinos, cães, ovinos e humanos de regiões de clima subtropical, tropical e temperada, pelo fato de o agente patogênico estar em ambientes aquáticos (MAULDIN; KENNEDY, 2016). O termo “pitiose” foi proposto como o mais adequado para se referir à doença, que tinha várias denominações, como “bursati”, “*Florida horse leeches*”, “dermatite granular”, “*hyphomycosis destruens equi*”, “*swamp cancer*”, ferida brava etc. (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO, 1980).

O ciclo de vida do *P. insidiosum* é ilustrado na figura 1. Quando o zoósporo entra em contato com a água (1) pode se anexar a uma planta hospedeira (2) e germinar formando micélios vegetativos (3). Encontrando condições favoráveis, os micélios da planta hospedeira natural (4) podem formar zoosporângios (5) (reprodução assexuada), que liberam zoósporos no meio ambiente (1), podendo se anexar a uma nova planta hospedeira. Mamíferos, quando entram em contato com zoósporos (6), pode desenvolver pitiose. Os “*kunkers*” (7) desenvolvidos nos equinos com pitiose podem também ser liberados para o ambiente aquático (7) e originar novos micélios e zoosporangios (8), reiniciando o ciclo biológico (LORETO; TONDOLO; SANTURIO, 2020, p. 7).

No Brasil, a doença ocorre predominantemente em equinos, porém, foram notificados surtos em ovinos e bovinos (SANTURIO et al., 2008; SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011). Em equinos há presença de *kunkers*, que são massas necróticas calcificadas semelhantes a corais (FOIL, 1996; MENDOZA, 1986). Conseqüentemente, acarretam significativos prejuízos agroeconômicos, já que se estimam casos em todos os estados. No Rio Grande do Sul a soroprevalência já registrada foi de 11,1%, segundo Weiblen et al. (2016), e o Pantanal brasileiro é o que apresenta a maior frequência de pitiose equina no mundo (SANTURIO et al., 2006; SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011).

**Figura 1** - Ilustração do ciclo de vida do *P. insidiosum* e do ambiente ótimo para a reprodução e sobrevivência.



(Fonte: adaptado de Loreto, Tondolo e Santurio, 2020).

A segunda espécie mais atingida é a canina, e as infecções manifestam-se pela formação de piogranulomas gastrointestinais e cutâneos (PEREIRA et al., 2013). Em cães o *P. insidiosum* tem tropismo por animais que tenham lesões provocadas por parasitas (NETO et al., 2010). Já em bovinos, não é muito frequente, entretanto há casos da forma cutânea (KRAJAEJUN et al., 2006) e também, é caracterizada pela autocura dos animais (SANTURIO et al., 1998). Assim, o que os diferencia das outras espécies acometidas, é a resposta inflamatória com padrão eosinofílico menos acentuado (GABRIEL et al., 2008; MARTINS et al., 2012).

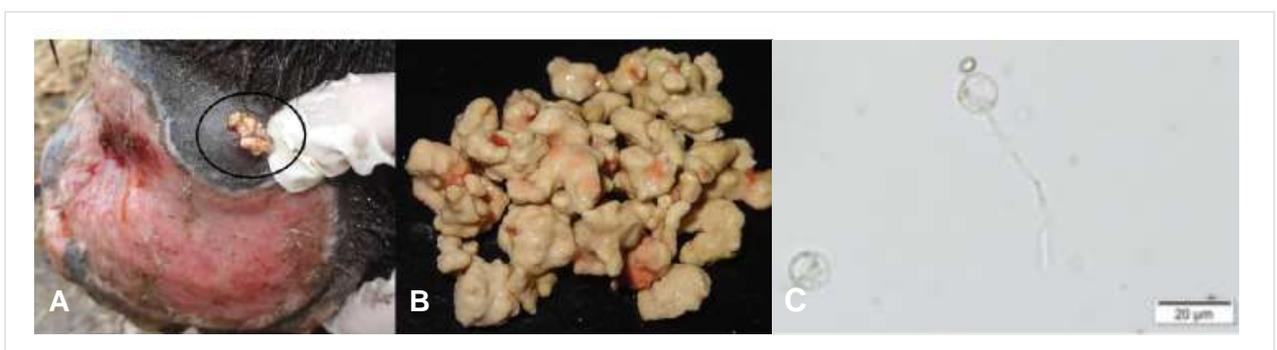
Como a doença acomete diferentes espécies de mamíferos, algumas singularidades são observadas, principalmente nas diferentes regiões. A grande parte dos relatos de casos em humanos foi no sudeste asiático, na Tailândia, local onde foram observados e descritos pela primeira vez (THIANPRASIT, 1986; LELIEVRE et al., 2015). Mas já foram registrados também na Índia, Austrália, Nova Zelândia, Haiti e Malásia, Israel, Estados Unidos, Canadá, Brasil e mais recentemente, na China, um caso de ceratite ocular em uma criança (SHARMA et al., 2015; GAASTRA et al., 2010; SHENEP et al., 1998; BOSCO et al., 2005; HE et al., 2016).

A apresentação clínica da pitiose humana pode ser subcutânea, vascular, ocular e sistêmica (INTARAMAT et al., 2016). Sendo que, algumas características são evidenciadas como predisponente: a atividade agrícola e de lazer associadas à

água e em indivíduos talassêmicos, podendo também infectar indivíduos hígidos, principalmente na forma ocular (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989; KRAJAEJUN et al., 2006). Estudos científicos em diferentes modelos experimentais têm sido realizados com o intuito de investigar e desenvolver tratamentos para pitiose. O coelho é um dos modelos mais antigos e que mimetiza com muito sucesso a doença (ZANETTE et al., 2013; SANTURIO et al., 2003), outros modelos também estão contribuindo para os estudos com *P. insidiosum* como *Drosophila melanogaster* (ZANETTE et al., 2013), modelo em camundongos BALB/C (TONDOLO et al., 2017; LORETO et al., 2019) e modelos em ovos embrionados (VERDI et al., 2018).

Em 1983, Miller e Campbell conseguiram reproduzir a pitiose de forma experimental em coelhos, através da inoculação subcutânea de zoósporos. Corroborando, Santurio et al. (2003) padronizaram o protocolo experimental e afirmaram que é necessária uma inoculação de no mínimo 17.500 mil zoósporos para gerar a doença de forma subcutânea. Então, o coelho é o principal modelo experimental *in vivo* para avaliar tratamentos para pitiose, entretanto, ele não produz os “*kunkers*”, massa eosinofílica característica da infecção natural. Mas, outros estudo como o de Loreto et al. (2019) avaliaram o tratamento em camundongos. A figura 2 ilustra os “*kunkers*” (somente produzidos por equinos) e os zoósporos.

**Figura 2:** (A) e (B) “*Kunkers*” de equinos. (C) zoósporos de *P. insidiosum*.



(Fonte: adaptado de Álvarez, Vilorio e Ayola, 2013 e Permpalung, Worasilchai e Chindamporn, 2019).

#### 4.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da pitiose é realizado com base na consideração epidemiológica, sinais clínicos, soro do paciente infectado e aspecto das lesões, sendo o isolamento

e a identificação do agente, importantes para o diagnóstico definitivo (SANTURIO et al., 2006). O diagnóstico laboratorial do *P. insidiosum* pode ser obtido pelo exame a fresco com 10% hidróxido de potássio (KOH) ou através do corante lactofenol azul (azul de algodão), os quais mostram apenas hifas hialinas, eventualmente septadas, e posterior cultivo em ágar ou caldo Sabouraud ou ágar sangue, conforme figura 3 (KRAJAEJUN et al., 2010), para efetuar o diagnóstico diferencial e não ser confundido com a maioria de fungos filamentosos.

A detecção de anticorpos anti-*P. insidiosum* pode ser analisada no soro de pacientes infectados (humanos ou animais) através do imunoensaio enzimático (ELISA), que detecta os anticorpos específicos com alto grau de sensibilidade e especificidade de 100%, possibilitando o diagnóstico de infecções precoces ou ainda subclínicas (SANTURIO et al., 2006; KEERATIJARUT et al., 2013). Também, pode ser realizado através de técnicas de biologia molecular, como *Nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR)*, as quais detectam o DNA do agente infeccioso, garantindo uma identificação preliminar a partir de hifas ou seus elementos (BOTTON et al., 2011; LORETO; TONDOLO; SANTURIO, 2020).

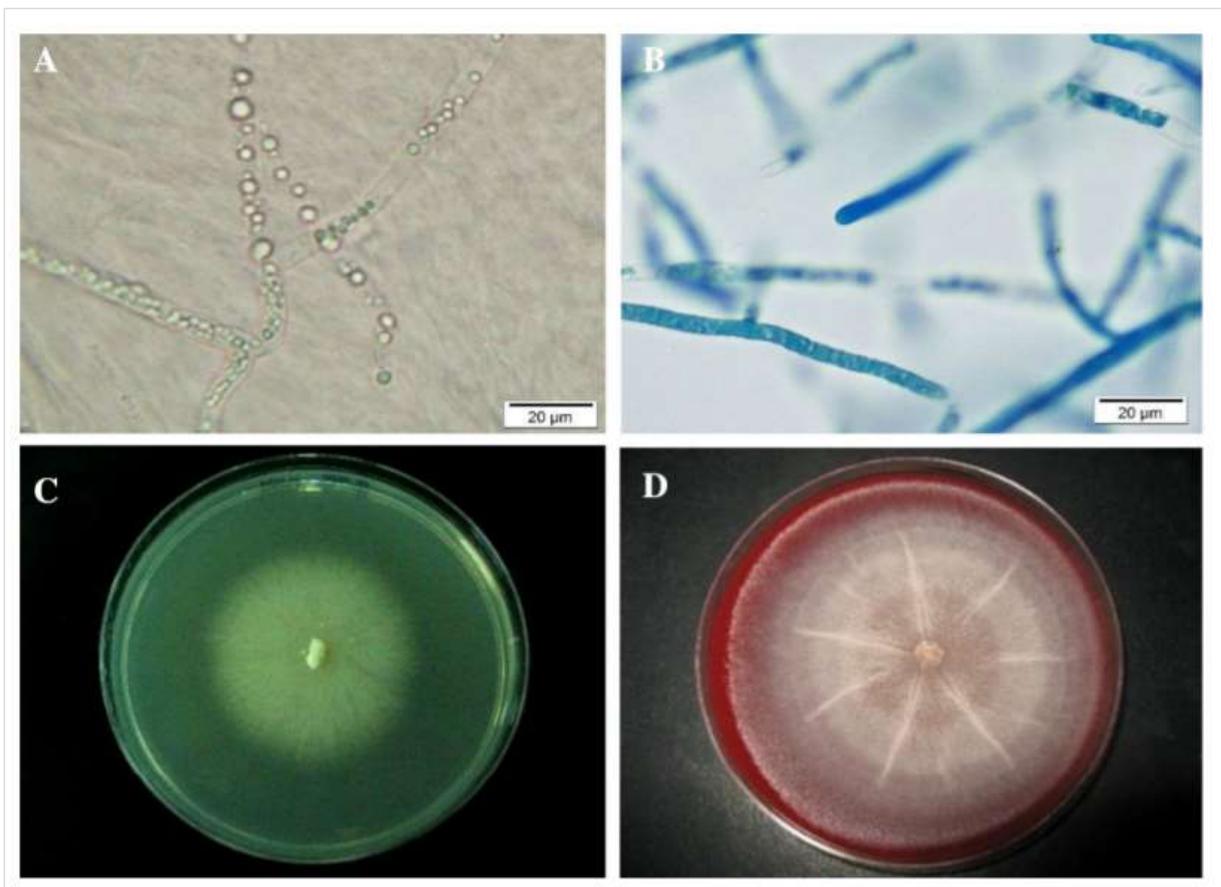
Outros métodos também podem auxiliar no diagnóstico precoce e correto da pitiose, como imunodifusão (MENDOZA et al., 1986), *western blot* (KRAJAEJUN et al., 2006), hemaglutinação (JINDAYOK et al., 2009), imunocromatografia (KRAJAEJUN et al., 2008). Ou ainda, examinar o potencial sérico de  $\beta$ -d-glucana (BG) e anticorpo específico para *P. insidiosum* como marcadores de monitoramento na pitiose vascular (WORASILCHAI et al., 2018).

As hifas do *P. insidiosum* são hialinas e cenocíticas, conforme ilustra a figura 3, com um diâmetro de 6 a 10  $\mu$ m em preparações histopatológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E). São encontradas no centro de microabcessos junto aos eosinófilos promovendo o fenômeno Splendore-Hoeppli. Na reação tecidual predominam os eosinófilos com formação de granulomas eosinofílicos com células gigantes, mastócitos e outras células inflamatórias (VILELA; MENDOZA, 2015).

A visualização do agente em cortes histológicos pode ser realizada também através da coloração de prata (Gomori-Grocott), e para visualização da resposta inflamatória utiliza-se ácido periódico de Schiff (PAS) (GAASTRA et al., 2010). Para confirmar os resultados histológicos tem-se utilizado a técnica de imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*P. insidiosum* (GABRIEL et al., 2008; FERNANDES et al., 2012; MARTINS et al., 2012). Além disso, o isolamento e a identificação do

oomiceto são importantes para o diagnóstico definitivo e diferencial, já que, também devem ser diferenciados, em equinos, de habronemose cutânea, e para outras espécies, carcinoma de células escamosas e granulomas bacterianos (CHAFFIN, et al., 1995; GROOTERS et al., 2002; SANTOS et al., 2011). Em humanos devem ser diferenciado de lagenidiose, mucormicose, aspergilose e penicilose (BOSCO et al., 2005; MENDOZA; PRASLA; AJELLO, 2004; REINPRAYOON et al., 2013).

**Figura 3** - (A) Exame a fresco com hidróxido de potássio (KOH) 10% com presença de hifas septadas. (B) Hifas de *P. insidiosum* esparsamente septadas em lactofenol azul. (C) Cultivo de dois dias a 37°C de *P. Insidiosum* em ágar Sabouraud dextrose 2%. (D) Cultivo de dois dias a 35°C de *P. Insidiosum* em ágar sangue.



(Fonte: Permpalung; Worasilchai; Chindamporn, 2019).

#### 4.2.3 Tratamento

Como o agente patogênico da pitiose apresenta características peculiares, muitos estudos tem sido realizados para compreender cada vez a patogênese da

doença. Geralmente utilizam-se tratamentos associados, sendo que as chances de ter um prognóstico favorável estão diretamente relacionadas com o diagnóstico precoce da doença, bem como, do tratamento (ARGENTA et al., 2010; LERKSUTHIRAT et al., 2017; RAMAPPA et al., 2017). Protocolos de tratamento para pitiose incluem: terapia com cirurgia, antimicrobianos e imunoterapia (SANTURIO et al., 2003; SANTURIO et al., 2006; JESUS et al., 2015). Sendo esta última, a alternativa com resultados mais promissores e que apresentou cura em cerca de 70% dos equinos e 55% em humanos (GAASTRA et al., 2010).

Como o *P. insidiosum* fora inicialmente classificado como um fungo, a terapia com antifúngicos, que tem como alvo a síntese do ergosterol, como os azólicos e outros que promovem alterações na membrana, foram e ainda são muito utilizados como principal tratamento (GAASTRA et al., 2010). Entretanto, esses tratamentos não apresentam muito sucesso, devido às características fisiológicas do agente. Portanto, não existem fármacos antifúngicos eficientes contra o oomiceto até o momento. Em controvérsia a este fato, alguns estudos relataram cura clínica em pacientes com essa classe de fármacos, conseqüentemente instigando outras pesquisas a respeito, para entender melhor este microrganismo e a patogenia da doença (DE SOUZA SILVEIRA VALENTE et al., 2016; GROOTERS, 2003; JESUS et al., 2015; LERKSUTHIRAT et al., 2017). Além disso, fatores como o tamanho e o tempo da lesão, idade, estado nutricional do hospedeiro, estão relacionados com o sucesso da terapia (SANTURIO et al., 2006).

O método cirúrgico é o tratamento mais comum, e desafiador, pois pode ser dificultado pelas estruturas anatômicas envolvidas, as quais se localizam perto de estruturas vitais. Entretanto, para a manutenção do tratamento, a quimioterapia geralmente é associada (DYCUS; FISHER; BUTLER, 2015). Comparado com a grande variedade de fármacos e associações antibacterianas, atualmente existem poucas classes de fármacos antifúngicos disponíveis, sendo que os principais alvos dos antifúngicos são os esteroides da membrana plasmática, a síntese de ácidos nucleicos e os constituintes da parede celular (quitina,  $\beta$ -(1,3)-glucana e manonoproteínas) (GUBBINS; ANAISSIE, 2009).

Os antifúngicos podem ser classificados em quatro classes principais de acordo como seu mecanismo de ação. O grupo dos poliênicos, que atuam na membrana plasmática; as pirimidinas, que promovem a inibição da síntese de ácidos nucleicos; os azólicos, que interferem na síntese do ergosterol e as equinocandinas,

que por sua vez, inibem a síntese de glucana da parede celular de diversos fungos patogênicos (LACAZ et al., 2002; WHITE et al., 2005; SIDRIM; ROCHA, 2010; CUENCA-ESTRELLA, 2010). De acordo com Sidrim e Rocha (2004), os triazólicos, apresentam efeitos colaterais reduzidos no hospedeiro, além de apresentar propriedades farmacocinéticas mais favoráveis permitindo uma terapia mais segura e eficaz. Entre eles, surgiram ainda na década de 90, os derivados morfolínicos, as alilaminas e as equinocandinas (no ano de 2000).

O desenvolvimento de antibacterianos apresenta vantagens sobre os antifúngicos, uma vez que existem múltiplos sítios de ação e ligação das bactérias que não estão presentes nas células dos mamíferos. Por outro lado, os fungos compartilham similaridades com as células de mamíferos, ambas são organismos eucariotos. Esta característica têm dificultado o desenvolvimento de fármacos que sejam seletivamente tóxicos para a célula fúngica, e não à célula hospedeira, conseqüentemente desafiando a pesquisa de novos fármacos, doses e sítios de ação (HARRIS, 2002; LERKSUTHIRAT et al., 2017).

De acordo com Rawn e Van Etten (1978) o gênero *Pythium* se difere dos fungos por também apresentar sensibilidade aos antibióticos ribossomos 70S ativos, como tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina e eritromicina. Conforme registrado por Tsao (1970) a sensibilidade de oomicetos fitopatogênicos da família Pythiaceae a antibióticos, tem sido relacionada apenas com a inibição do crescimento. Rawn e Van Etten (1977) desenvolveram um estudo, que detectou efeitos em curto prazo de antibióticos nestes fungos, com tetraciclina e cloranfenicol, e evidenciou a inibição da incorporação de aminoácidos em um isolado de *Pythium ultimum*. Outro estudo, um ano depois, verificou também ação inibitória de tetraciclina, eritromicina, ciclohexamida e cloranfenicol incorporados a meio de cultura em caldo, frente ao *Pythium ultimum* (RAWN; VAN ETTEN, 1978).

Além disso, estudos recentes relatam a sensibilidade do *P. insidiosum* a agentes antibacterianos, que pertencem às classes de macrolídeos, tetraciclina e glicilciclina (MAHL et al., 2012; LORETO et al., 2011) que quando combinada com fármacos antifúngicos, resultam em interação sinérgica *in vitro* (JESUS et al., 2014). De acordo com os resultados *in vitro* demonstrados por Jesus et al. (2014), os antibióticos podem ser uma opção de tratamento mais eficaz, pois se verificou que a combinação de azitromicina, claritromicina, minociclina, ou a tigeciclina, com agentes antifúngicos resultaram em interações sinérgicas. Outro estudo relatado por

Ramappa et al. (2017) demonstrou um caso bem-sucedido da queratite oftálmica causada por *P. insidiosum*, com a administração de uma terapia combinada, consistindo em colírio de linezolid 0,2%, azitromicina 1%, sulfato de atropina 1% e azitromicina 500 mg por via oral, uma vez por dia durante 3 dias.

Dentre as tetraciclinas estudadas, a minociclina possui uma variedade de ações biológicas que estão além da atividade antimicrobiana, como anti-inflamatória (GIULIANI; HADER; YONG, 2005), antioxidantes, anti-apoptóticas, inibidora de proteólise, supressora da angiogênese e de metástases tumorais, imunomoduladoras (GARRIDO-MESA, ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013; POPOVIC et al., 2002; SAPADIN, 2006), e efeitos neuroprotetores e antivirais (LEMAITRE et al., 1990; DOMERQ; MATUTE, 2004; NAGARAKAN; BISHBURG, 2016). Além disso, apresentou relevantes resultados, que influenciaram na cura ou sobrevida de coelhos com pitiose infectados experimentalmente (JESUS et al., 2016).

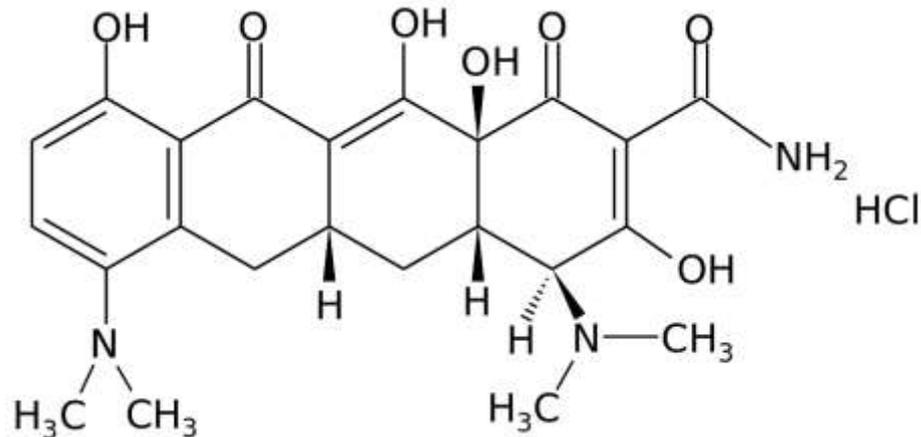
A minociclina (7-dimetilamino-6-dimetil-6-desoxitetraciclina) é uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração que tem sido usada em terapia por mais de 30 anos por suas propriedades antibióticas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, atuando na inibição da síntese proteica, interrompendo o processo em que o RNA transportador (tRNA) apresentaria um aminoácido para alongar a cadeia de aminoácidos e formar uma proteína celular (CHOPRA; ROBERTS, 2001; NAZARIAN; AKHONDI, 2020). Sua estrutura química básica é constituída por naftaceno-carboxamida, molécula altamente lipofílica, com substituintes em diferentes posições (Figura 4) (LERKSUTHIRAT et al., 2017).

O perfil farmacocinético favorece sua utilização pela via oral (mais utilizada), sendo rapidamente metabolizada e com biodisponibilidade de quase 100% e segurança comprovada, quando utilizada por longo tempo (GARRIDO-MESA, ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013). Além disso, a minociclina apresenta capacidade de limitar o dano tecidual nos rins, coração, pulmão e células neurais (JORDAN et al., 2007). E ainda, ela contribui para inibir as espécies reativas de oxigênio e as metaloproteinases da matriz (MMP) juntamente com efeitos anti-apoptóticos. (SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006).

Já a imunoterapia tem sido uma alternativa para o tratamento da pitiose desde 1981, quando Miller desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do próprio oomiceto, utilizando as hifas sonicadas, e mostrou uma eficácia entre 53 e 75%, quando associado à cirurgia (MILLER, 1981; MILLER; CAMPBELL, 1982). Na

tentativa de aperfeiçoar a técnica de preparo da vacina, Mendoza e Alfaro, em 1986, utilizaram o sobrenadante das culturas como antígeno e obtiveram resultados satisfatórios em relação ao prognóstico e evolução da pitiose.

**Figura 4-** Estrutura química da Minociclina.



(Fonte: adaptado de Lerksuthirat et al., 2017).

Então, a partir desse fato, vários autores tentaram modificar a técnica de preparação do imunoterápico na tentativa de obter melhores resultados, sendo que o índice de cura variou entre 50 e 83,3%, em equinos (THITITHANYANONT et al., 1998; MONTEIRO, 1999). Já em coelhos tratados experimentalmente, de acordo com Santurio et al. (2003) a cura chegou a ser 71,8%. Esses autores estudaram e avaliaram extratos antigênicos a partir da massa micelial inativada. A figura 5 ilustra a vacina produzida por este grupo de pesquisa.

Em humanos, um imunoterápico foi utilizado pela primeira vez, num menino tailandês que não respondia ao tratamento quimioterápico, apresentou cura após um ano. A porcentagem de cura em humanos é estimada para 55%, sendo que a diminuição da eficácia do imunoterápico ocorre a partir da cronicidade da doença (THITITHANYANONT et al., 1998; SANTOS et al., 2012).

**Figura 5:** PITIUM-VAC imunoterápico para tratamento da pitiose desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).



(Fonte: <http://vacinacontrapitiose.blogspot.com/>)

Alguns métodos de preparação do imunoterapêutico foram descritos na literatura (MILLER, 1981; MENDOZA et al., 1996), mas Santurio et al. (2003) analisaram os preparados a partir de hifas submetidas a sonicação, maceração (ou liquefação) ou a combinação dessas duas técnicas na pitiose experimental em coelhos e observaram que o imunoterapêutico macerado apresentou a melhor resposta, levando a uma redução de 71,8% no tamanho da lesão com cura clínica de dois coelhos (n = 5). Em 2013, Santos et al. demonstraram uma eficácia de 79,4% da imunoterapia em equinos, o mesmo não acontece em cães e gatos, apenas 33% dos caninos se curam, enquanto os gatos não respondem (MENDOZA; NEWTON, 2005).

No entanto, o uso de imunoterapia contra pitiose não induz uma resposta protetora contra reinfecções, podendo ocorrer uma nova infecção (SANTOS et al. 2011). Neste contexto, muitos esforços têm sido feitos para investigar um mecanismo de proteção imunológica, como o proposto por Tondolo et al. (2017), os quais extraíram e identificaram um (1,3) (1,6) - $\beta$ -d-glucano altamente ramificado do micélio de *P. insidiosum* que demonstrou induzir uma imunidade celular Th17 significativa e específica resposta em camundongos BALB/c pré-imunizados. Já Ledur et al. (2018) testou células dendríticas preparadas (DCs) com esse mesmo

glucano, zoósporos inativados pelo calor e o imunoterápico PitiumVac<sup>®</sup> e concluiu que há proliferação linfocitária induzida por DCs iniciadas com esses antígenos e que promove a ativação do subconjunto Th1 e Th17.

#### 4.2.4 Resposta imunológica do hospedeiro

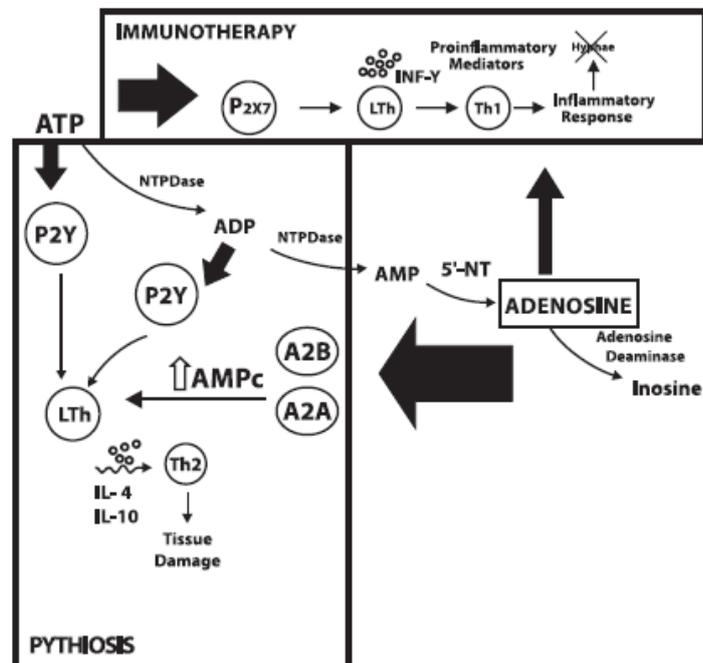
O *P. insidiosum* possui atração por pêlos, tecido animal e vegetal, sendo a quimiotaxia atribuída a algumas substâncias presentes nesses tecidos. Apesar de muitos estudos sobre a pitiose, ainda não há um completo conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na infecção (SANTURIO et al., 2006). De acordo com Miller (1981) como a maioria dos animais infectados são imunocompetentes, sugere-se que ocorre uma resposta imunológica inadequada ou bloqueios no organismo que possam estar impedindo a eliminação do *P. insidiosum*.

Corroborando Mendoza, Ajello e McGinnis (1996) sugeriram que pode haver um mecanismo semelhante às infecções parasitárias. Então, após estar nos tecidos, o zoósporo se ligaria à superfície do hospedeiro, formando o tubo germinativo, em seguida as hifas liberariam exoantígenos, as quais desencadeariam uma resposta imune e produção de imunoglobulina E (IgE). As células apresentadoras de antígenos (APCs) secretariam interleucina-4 (IL-4) e conseqüentemente direcionariam os linfócitos T help naïve (Th0) em T helper 2 (Th2), que estimularia a produção de mais IL-4 e IL-5 para manter a resposta Th2. Através da reação de Splendore-Hoeppli, os eosinófilos degranulados e mastócitos ao redor da hifa, desencadeiam rapidamente um dano tecidual extenso, como estratégia de sobrevivência e mecanismo de defesa do *P. insidiosum* (ÁLVAREZ; VILORIA; AYOLA, 2013; GAASTRA et al., 2010; MENDOZA; NEWTON, 2005).

Sendo assim, foi atribuído que a imunidade humoral em hospedeiros infectados com pitiose desencadeia apenas precipitação e aglutinação de anticorpos anti-*P. insidiosum* relacionada com uma resposta imune Th2, e que seriam importantes para diagnosticar a doença (MENDOZA et al., 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005). Neste sentido, Gaastra et al. (2010) afirmaram que os níveis elevados de interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-2 (indicadores de imunidade mediada por células Th1) e a diminuição de células Th2, estariam presentes em pacientes curados.

Corroborando, Bach et al. (2013) realizaram estudos em linfócitos de coelhos infectados experimentalmente com o *P. insidiosum* e sugeriram que a resposta imune Th2, durante a infecção, pode ser estimulada pela ativação dos receptores purinérgicos P2Y dos linfócitos, o que conseqüentemente levaria à lesão tecidual, conforme figura 6. Assim, o envolvimento do sistema purinérgico durante a pitiose, torna-se um alvo importante para estudos científicos, já que, pode colaborar para elucidar melhor o mecanismo ocorrido na pitiose e na cura, através dos nucleotídeos de adenina e seu derivado nucleosídeo adenosina. Os quais são secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas, que medeiam os diversos efeitos biológicos (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

**Figura 6** - Representação do efeito extracelular da adenosina trifosfato (ATP) e concentrações de adenosina na resposta imunológica durante a pitiose e tratamento com imunoterapia em linfócitos de coelhos.



(Fonte: adaptado de Bach et al., 2013).

Particularmente, as plaquetas desempenham um papel fundamental na hemostasia, quanto à atividade mecânica e bioquímica, intervindo rapidamente na presença de lesões endoteliais (DANIEL et al., 1998; FROJMOVIC; PANJWANI, 1976). As plaquetas são células discóides, anucleadas, tem aproximadamente 3 µm

de diâmetro, forma e tamanho variável, possuem um importante papel na manutenção da integridade endotelial, entretanto, apresentam-se como células incompletas formadas apenas por porções do citoplasma das células que lhes dão origem, os megacariócitos (FROJMOVIC; PANJWANI, 1976; LORENZI et al., 2003).

Na região das organelas existem vários tipos de estrutura como corpos densos (cálcio, nucleotídeos, serotonina, pirofosfato), grânulos alfa (fatores de crescimento, fatores de coagulação e proteínas de adesão), lisossomas, mitocôndrias, glicogênio e um sistema de membranas internas, local de síntese de prostaglandina e tromboxano (LORENZI et al., 2003). Além disso, as plaquetas também exercem fundamental papel no processo de crescimento de tumor, ataque à patógenos e modulação da imunidade adaptativa (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011).

Sob condições fisiológicas normais as plaquetas circulam no sangue com mínima interação com outras células ou com a parede do vaso, podendo ser ativadas por estímulos a qualquer momento, incluindo o fluxo sanguíneo turbulento, bem como o colágeno exposto das paredes dos vasos lesionados, participando assim da resposta inflamatória e agindo na vasculatura (MASSBERG et al., 2002; WEKSLER, 1992). A interação adesiva com as plaquetas pode ser mediada por CD40L (CD154; gp39), o qual se liga ao CD40 endotelial, induzindo a expressão superficial de várias moléculas de adesão chave (E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1), bem como a liberação de citocinas, como a IL-8. Essa ativação do endotélio atrai neutrófilos, células T e monócitos circulantes para a adesão ao endotélio inflamado, levando à inflamação vascular e à formação de placas (HENN et al., 1998; RAHMAN et al., 2012).

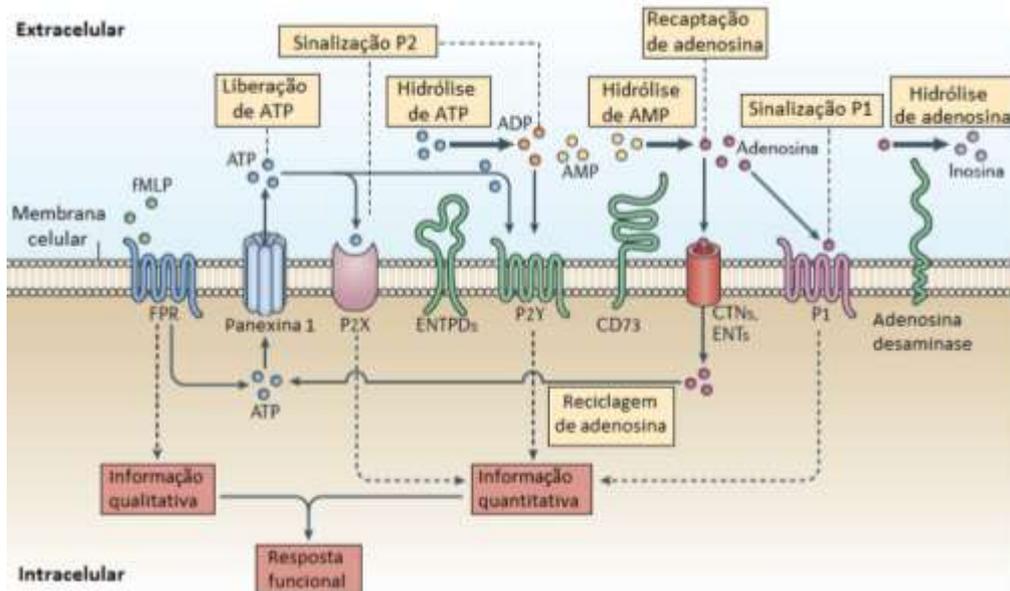
CD40L é um membro da família do fator de necrose tumoral (TNF) sendo o ligante do receptor de TNF, CD40. O CD40 é encontrado em uma variedade de células, incluindo células B e células endoteliais, e a interação entre CD40 e CD40L é importante na regulação da imunidade adaptativa. Além de seu estado ligado à superfície, o CD40L também é clivado pelas metaloproteinases (MMP) (HENN et al., 1998; LAM; VIJAYAN; RUMBAUT, 2015). Após estimulação, as plaquetas liberam uma variedade de moléculas biologicamente ativas a partir dos seus grânulos de armazenamento, incluindo fatores mitogênicos, proteases, coagulação e fatores fibrinolíticos, citocinas e quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, adenosina trifosfato (ATP) e difosfato (ADP), e cálcio (NURDEN, 2011).

#### 4.2.5 Sistema purinérgico

Considerando que as respostas imunes são elaboradas após a infecção para conter o agente patogênico, neste contexto, o sistema purinérgico também desempenha relevante papel, através das biomoléculas (ZIMMERMANN, 2000). As sinalizações purinérgicas são compostas por três principais componentes: os nucleotídeos de adenina e seu nucleosídeo adenosina, que são mediadores da sinalização; os receptores, através dos quais estes nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos e, as ectoenzimas, responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas (YEGUTKIN, 2008).

Os nucleotídeos da adenina: ATP, ADP, adenosina monofosfato (AMP) e o seu derivado, adenina, são secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais, sendo essenciais para o início e manutenção das reações inflamatórias, modulando a resposta imune (BURNSTOCK, 2002; YEGUTKIN, 2008). O sistema purinérgico é caracterizado por ser uma via de sinalização importante em diversos tecidos, o qual desencadeia inúmeros efeitos biológicos-celulares, na resposta imune, na inflamação, na dor, na agregação plaquetária, na proliferação e morte celular (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004). A sinalização induzida por estas moléculas correlaciona-se diretamente à atividade de enzimas localizadas na superfície da membrana célula (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). A figura 7 ilustra os componentes do sistema purinérgico.

**Figura 7-** Componentes da sinalização purinérgica. As ectonucleotidases ENTPDase e CD73 promovem a hidrólise de ATP e a formação de adenosina que ativa os receptores P1. A adenosina pode ser convertida à inosina pela enzima adenosina desaminase ou pode ser recaptada através de transportadores de nucleosídeos (ENTs).



(Fonte: adaptado de Junger, 2011).

Os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina modulam as ações das plaquetas durante o processo inflamatório, representando uma importante classe de moléculas extracelulares, que interagem com receptores purinérgicos, na superfície celular (DI VIRGILIO, 2001). O ATP pode estimular a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , bem como, a proliferação de linfócitos e influência sobre a tromborregulação juntamente com o ADP (BOURS et al., 2006; SOSLAU; YOUNGPRAPAKORN, 1997). O ADP possui papel definido apenas nas plaquetas, agindo também como um importante mediador da agregação plaquetária, e indutor da formação de trombos no interior de vasos, podendo ser liberado na circulação sanguínea após danos teciduais (MARCUS et al., 2003; ZIMMERMANN, 1999).

O AMP exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo, servindo também como substrato para a formação da adenosina (CUNHA, 2001; LATINI; PEDATA, 2001), a qual é reconhecida por possuir propriedades anti-inflamatórias (CRONSTEIN, 1994), vasodilatadoras (JACOBSON et al., 2006), e imunossupressoras (SPYCHALA et al., 1997), além de atuar como um potente inibidor da agregação plaquetária (BOROWIEC et al., 2006).

Os nucleotídeos extracelulares exercem suas ações biológicas através de receptores purinérgicos (P), específicos presentes da superfície celular (DI VIRGÍLIO et al., 2001). Assim, o ATP extracelular e seus metabólitos são reconhecidos por purinoreceptores, P1 (subtipos: A1, A2A, A2B e A3) e P2 (subtipos: P2X e P2Y)

(BURNSTOCK, 2007). Já o controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos da adenina e da adenosina é realizado pelas ectonucleotidasas, uma família de enzimas ancoradas à superfície celular ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel, sendo amplamente distribuídas nos tecidos (BURNSTOCK, 2016; ZIMMERMANN et al., 2012). O tipo P1 é responsivo à adenosina e tipo P2 responde a ATP, ADP, UTP, UDP e não para AMP. Enquanto o ATP pode ativar os receptores P2X e P2Y, o ADP interage com o receptor do subtipo P2Y (BURNSTOCK, 2001; SHETINGER et al., 2007).

As ectonucleotidasas (E-) são classificadas como E-NTPDase (Apirase; E.C. 3.6.1.5), que hidrolisa ATP em ADP; E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase; EC 3.1.4.1), que hidrolisa o ATP diretamente à AMP; E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), responsável pela hidrólise de AMP formando adenosina; e a adenosina deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), responsável pela desaminação do nucleosídeo adenosina, gerando inosina (ANTONIOLI et al., 2008; GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN, 2012).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ARTIGO 1

#### 5.1.1 *In vivo* effect of minocycline alone and in combination with immunotherapy against *Pythium insidiosum*.

Aceito para publicação na Revista *Veterinary Microbiology*.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## In vivo effect of minocycline alone and in combination with immunotherapy against *pythium insidiosum*



Carine E.P. Zimmermann<sup>a,\*</sup>, Francieli P.K. Jesus<sup>a,b</sup>, Karine B. Schlemmer<sup>a</sup>, Érico S. Loreto<sup>a,b</sup>, Juliana S.M. Tondolo<sup>a,b</sup>, David Driemeier<sup>c,d</sup>, Sydney H. Alves<sup>d,e</sup>, Laerte Ferreira<sup>c,b</sup>, Janio M. Santurio<sup>a,h,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacológicas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Pythiosis  
 Minocycline  
 Fungistatic activity  
 Immunotherapy  
 Picim-Vac<sup>®</sup>

### ABSTRACT

This study examined the effect of minocycline alone and in combination with immunotherapy against pythiosis. Twenty rabbits, aged three months old and subcutaneously inoculated with *Pythium insidiosum* zoospores were divided into four groups (n = 5): treated with minocycline (10 mg/kg/day twice daily), treated with immunotherapy (34 mg subcutaneously every 14 days), treated with minocycline plus immunotherapy, and untreated (control group). The treatments were started 30 days after inoculation and continued for 70 days. The subcutaneous nodular injury areas in infected groups were measured every seven days after the beginning of treatment. Only the rabbits that developed lesions were selected for this study. When compared with the control group over 70 days, the minocycline and minocycline plus immunotherapy groups of rabbits with pythiosis showed significantly reduced injuries. The histopathology showed the presence of inflammation, macrophages and eosinophils. Grocott's staining revealed irregular hyphae-like structures that were ramified and occasionally septate. Our results suggest that minocycline has fungistatic activity and that the combination of minocycline and immunotherapy is more effective than the individual therapies tested.

### 1. Introduction

Pythiosis is a chronic disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*, which is a eukaryotic organism that inhabits water ecosystems, has no ergosterol in its cytoplasmic membrane and forms filamentous structures similar to the mycelia of true fungi during growth (Lerknathirat et al., 2017; Cuenca-Estrella et al., 2010). Infected animals usually acquire the disease after long periods spent in contact with stagnant water, where *P. insidiosum* realizes its reproductive cycle. The most frequently affected species are equines, canines and humans, especially those inhabiting tropical, subtropical or temperate regions (Intarumrat et al., 2016).

Many cases of pythiosis have been treated with antifungal drugs due to the morphological similarity of *P. insidiosum* with fungi (Gautrea

et al., 2010). Despite a few reports of successful treatment with antifungal drugs (Sudjaritruk and Srisanthana, 2011), many studies have demonstrated their ineffectiveness (Krajaeju et al., 2006; Permpalung et al., 2015). Thus, different therapeutic protocols have been used for the treatment of pythiosis in animals and humans, including surgical methods, immunotherapy, antifungal and antibacterial drugs, or sometimes a combination of these types of treatment (Loreto et al., 2011; Pereira et al., 2008; Loreto et al., 2014; Jesus et al., 2016).

Immunotherapy constitutes an important alternative for the treatment of equine pythiosis, with cure rates that vary from 50 to 80% (Blendoza and Newton, 2008; Santos et al., 2011). The cure rates obtained using immunotherapy for the treatment of pythiosis are considered good, and the treatment is inexpensive. However, there are cases that do not respond to this therapy, which consequently indicates

\* Corresponding authors at: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Borsoi n° 1000, Prédio 20, Sala 4139, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

E-mail addresses: [carine\\_zimmermann@ufsm.br](mailto:carine_zimmermann@ufsm.br) (C.E.P. Zimmermann), [santurio@uol.com.br](mailto:santurio@uol.com.br) (J.M. Santurio).

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108616>

Received 26 July 2019; Received in revised form 16 February 2020; Accepted 20 February 2020  
 0378-1135/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

that new treatment strategies are required (Pereira et al., 2008). The hope for the treatment of pythiosis with antibiotic agents has arisen from studies demonstrating the *in vitro* and/or *in vivo* susceptibility of *P. insidiosum* to classes of these drugs, such as tetracyclines (Loreto et al., 2011).

Minocycline (7-dimethylamino-6-dimethyl-6-deoxytetracycline) is a second-generation semisynthetic tetracycline that has been used clinically for more than 30 years for its antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria, in which it inhibits protein synthesis (Garrido-Mesa et al., 2013; Lerkasuthirat et al., 2017). Therefore, this study evaluated the *in vivo* effect of minocycline alone and in combination with immunotherapy to treat experimental pythiosis in rabbits.

## 2. Materials and methods

### *Pythium insidiosum*

The clinical isolate of *P. insidiosum* used for the induction of experimental pythiosis (isolate 290) was genotyped and registered under GenBank accession number KJ176713, according to Jesus et al. (Jesus et al., 2016).

### Zoosporegenesis

Ten pieces of *Paspalum notatum* grass, approximately 2 cm in length, were autoclaved, distributed over *P. insidiosum* cultures, and incubated at 37 °C for 24 h. Pieces of infected grass were transferred to an induction medium that contained the following: solution 1:  $K_2HPO_4$  1.0 M (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brazil),  $KH_2PO_4$  1.0 M (Vetec<sup>®</sup>),  $(NH_4)_2$  3.66 M (Vetec<sup>®</sup>), and 500 ml of distilled water; solution 2:  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.5 M (Vetec<sup>®</sup>),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.5 M (Vetec<sup>®</sup>), and 250 ml of distilled water. The final induction medium composition was 0.5 ml of solution 1 and 0.1 ml of solution 2 in 1000 ml of sterile distilled water. Induction medium containing pieces of grass infected with *P. insidiosum* was incubated at 37 °C for 8 h. Pieces of grass were observed by microscopy, and zoospores were counted using a Neubauer chamber.

### Animals

Twenty New Zealand rabbits aged three months old were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Santa Maria (UFPM). The rabbits were housed four/three per cage in a cycle of 12/12 h light and dark maintained artificially. The animals were kept in a temperature range of 16–22 °C and 60–65 % relative humidity; they received 100 g of commercial food for rabbits, vegetable fiber and water *ad libitum*. The Ethics Committee on Animal Experiments of UFPM approved all the animal procedures (protocol number: 055/2012).

### Experimental pythiosis and treatment

The rabbits were subcutaneously inoculated with *P. insidiosum* zoospores and divided into four groups ( $n = 5$ ): treated with minocycline (PharmaNostra<sup>®</sup> Rio de Janeiro, Brazil) (10 mg/kg/day twice daily by oral administration), Pitium-Vac<sup>®</sup> immunotherapy (34 mg subcutaneously every 14 days), minocycline plus immunotherapy, and a control group infected. Inoculated rabbits were checked weekly, and the subcutaneous nodular area ( $cm^2$ ) was measured using a sliding caliper when nodules were present. Nodular development was evaluated 30 days after inoculation. ELISA was used to confirm the early diagnosis of *P. insidiosum* infection prior to nodule development, as described by Santurio et al. (Santurio et al., 2003, 2006).

The first dose of immunotherapy in this study was administered subcutaneously on the 30th day after inoculation in the distal region opposite to the zoospore injection site. This procedure was repeated

every 14 days for a total of four injections. The treatment with minocycline was based on the *in vitro* and *in vivo* susceptibility results reported by Jesus et al. (2016). The animals were treated for 70 days after the development of lesions, with minocycline PharmaNostra<sup>®</sup> 10 mg/kg/day twice daily by oral administration and Pitium-Vac<sup>®</sup> immunotherapy 34 mg subcutaneously every 14 days.

### Preparation of biological samples

At the end of the experiment, the surviving animals (seventeen) were euthanized through deepening of anesthesia using thiopental (60 mg/kg). Representative tissues from the subcutaneous tumor-like injury region, lung, and kidney were subjected to further microbiological culturing in Sabouraud's dextrose agar and direct detection of *P. insidiosum* by histopathological analysis. To quantify the oomycete load, tissue sections were stained with methenamine silver stain to analyze visible hyphae. The inflammatory responses were observed by hematoxylin-eosin (H&E) staining and Grocott's stain. A scoring system of 0–4 for each parameter was developed. For quantification of the fungal load, it was used magnification of  $\times 400$  to analyze granulomatous tissue slices stained by methenamine-silver stain and scored as 0 (if no filaments were visible) or as 1–4 according stained fungal structures (score 1: rare; score 2: few; score 3: moderate; score 4: many).

### Statistical analysis

The areas of the lesions ( $cm^2$ ) were analyzed by Pearson's linear correlations analysis using a significance level of 5%. All analyses were performed using GraphPad Prism 6.

## 3. Results

### Induction of experimental pythiosis in rabbits

All rabbits in the experiment contained lesions characteristic of pythiosis. When the treated groups were compared to the control group, it was observed that the treatments significantly reduced the lesions in rabbits with pythiosis.

The variation in *P. insidiosum*-induced subcutaneous nodular lesion areas ( $cm^2$ ) in rabbits receiving minocycline or immunotherapy and minocycline plus immunotherapy is summarized in Fig. 1. When the mean lesion areas were compared using Pearson's linear correlation analysis, the animals from the control group showed larger lesion sizes than the animals from the immunotherapy and minocycline treatment

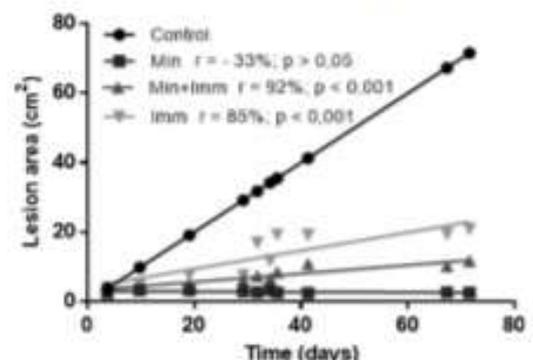


Fig. 1. Mean lesion areas of rabbits experimentally inoculated with *P. insidiosum* zoospores. Pearson's linear correlation analysis showed involution lesions in the Min + Imm group and in the Min alone and Imm alone groups during treatment. *P*-value was calculated based on the comparison the mean lesion areas (between day 0 and day 70) of each treated group with the control group. Min: minocycline; Imm: immunotherapy.

**Table 1**

P-value of lesion areas per week of rabbits experimentally inoculated with *P. insidiosum* zoospores and that received treatment with minocycline and immunotherapy, and were compared with control group at each time point (i.e., days-week) during 70 days.

Duration (Days)	Treatment (P-value)			
	Control	Min	Min + Imm	Imm
7	3.75 (P = 0.0055)	2.34 (P = 0.0061)	4.02 (P = 0.0072)	4.00 (P = 0.0074)
14	9.82 (P = 0.0002)	3.26 (P = 0.1588)	3.33 (P = 0.1504)	4.83 (P = 0.0453)
21	19.08 (P = 0.0004)	3.17 (P = 0.4920)	5.02 (P = 0.2827)	7.68 (P = 0.1103)
28	29.18 (P = 0.0003)	2.96 (P = 0.6686)	6.11 (P = 0.3825)	7.49 (P = 0.2876)
35	34.19 (P = 0.0009)	3.26 (P = 0.7524)	6.84 (P = 0.4630)	11.80 (P = 0.2050)
42	31.78 (P = 0.0172)	2.68 (P = 0.7898)	7.32 (P = 0.4713)	16.97 (P = 0.1118)
49	35.53 (P = 0.0111)	2.56 (P = 0.8041)	8.40 (P = 0.4228)	19.28 (P = 0.0825)
56	41.32 (P = 0.0061)	2.42 (P = 0.8231)	10.82 (P = 0.3280)	30.97 (P = 0.0062)
63	67.32 a (P = 0.0005)	2.65 b (P = 0.7850)	10.24 b (P = 0.3058)	19.51 ab (P = 0.0669)
70	71.55 a (P = 0.0009)	2.48 b (P = 0.8348)	11.68 b (P = 0.3101)	20.87 ab (P = 0.0853)

<sup>a–c</sup> Means within a row, not sharing a common superscript, are significantly different ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>1</sup> Data represent means from 5 replicates per treatment (i.e., Min, Imm, Min + Imm),  $n = 5$ .

Min: minocycline; Imm: immunotherapy.

groups. The minocycline plus immunotherapy ( $r = 0.9212$ ) group showed a significant decrease in lesion size compared to the control group and to the immunotherapy ( $r = 0.8577$ ) and minocycline ( $r = -0.3343$ ) alone groups. P-value was calculated based on the comparison the mean lesion areas (between day 0 and day 70) of each treated group with the to the control group.

The Table 1 demonstrate P-value of lesion areas per week of rabbits experimentally inoculated with *P. insidiosum* zoospores and that received treatment with minocycline and immunotherapy, and were compared with control group at each time point (i.e., days-week) during 70 days. In the minocycline plus immunotherapy group, one animal showed a total reduction in the lesion in the sixth week (42 days) of treatment; in the control group, two animals died in the sixth week (42 days) of treatment, and one died in the ninth week (63 days) of treatment. Necropsies indicated that their deaths were caused by pythiosis metastasis in the lungs and kidneys.

#### Histopathological analysis

From the confirmation of pythiosis through the ELISA test, as described by Santurio et al. (2006), a blinded histopathological analysis was also performed. The H&E stained subcutaneous lesion tissue from rabbits inoculated with *P. insidiosum* showed the presence of multifocal-to-coalescent pyogranulomatous inflammation, areas with caseous necrotic content, giant cells, and macrophages with a vacuolated cytoplasm and abundant eosinophils. These characteristics were reduced in the subcutaneous injuries and absent in the organs of the treated groups. Grocott's stain revealed irregular hyphae-like structures that were ramified and occasionally septate (Fig. 2).

#### 4. Discussion

In the present study, we compared the *in vivo* effects of minocycline, immunotherapy and minocycline plus immunotherapy in *P. insidiosum*-infected rabbits. Our study, as well as that of Jesus et al. (2016) showed *in vivo* that minocycline treatment reduces the progression of subcutaneous lesions when compared to no treatment, which Jesus deemed to be due to fungistatic activity. Treatment with oral minocycline was also investigated in a patient with ocular pythiosis who successfully treated (Castellar et al., 2017). Consistently, a recent study by Maeno et al. (2018) reported a successful case of *P. insidiosum* keratitis that responded to a triple regimen of minocycline, linezolid, and chloramphenicol.

As a foundation for our study, we analyzed the research of Lovren et al. (2014), who previously observed that antibacterials that act by inhibiting protein synthesis, such as minocycline, are promising

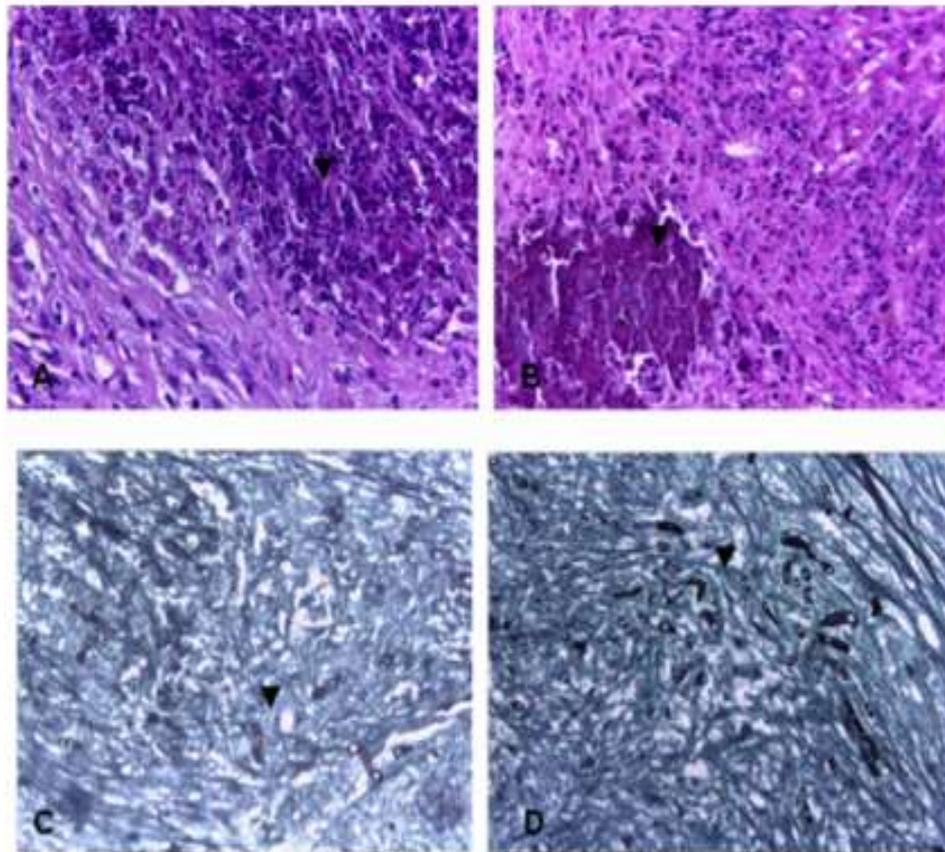
candidate therapies for the treatment of pythiosis. Another study showed a possible treatment approach, complementary to the main therapies for pythiosis, using combinations of topical antibiotics, such as cetrizide and cetylpyridinium, plus azithromycin or terbinafine (Itaqui et al., 2016) or linezolid and chloramphenicol (Maeno et al., 2019).

Our study showed that the treatment with minocycline and immunotherapy individually or in combination resulted in reduced injuries in infected rabbits. Consistent with the present study, Pereira et al. (2008) also compared immunotherapy and caspofungin treatments, which were found to considerably reduce the subcutaneous lesion areas; however, the growth of the injuries resumed after the end of drug administration. In contrast, in the present study, we observed the healing of an animal in the group treated with minocycline plus immunotherapy, prompting the hypothesis that minocycline enhances the effect of the treatment. This treatment effect may have happened because of the immunomodulatory activity of minocycline that has been demonstrated in previous studies (Kloppenborg et al., 1994; Agnihotri and Gaur, 2010).

Previous studies have shown that drugs of the tetracycline family have anti-inflammatory and antibacterial properties and are useful for the treatment of chronic inflammatory diseases (Golob et al., 1998; Voil et al., 2005). These agents decrease the activity of collagenase, phospholipase A<sub>2</sub>, and several matrix metalloproteinases, and they decrease the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in a wide range of tissues; these drugs also suppress various cell lines, including neutrophils and T lymphocytes (Kraaker and Buckley, 2003; Sapadin and Fleischmajer, 2006; Agnihotri and Gaur, 2010).

The immune status of the animal treated with minocycline and minocycline plus immunotherapy reinforces previously suggested hypotheses (Mendoza and Newton, 2005), such as those by Bach et al. (2010) and Bach et al. (2012). Additionally, these results suggest that minocycline alone is an important drug that should be administered until the thirteenth day of treatment for pythiosis due to the window of action of immunotherapy, i.e., the formation of antibodies can take from seven to fourteen days and from the fourteenth day only immunotherapy is required, as demonstrated by the ELISA test (Santurio et al., 2006). Thus, minocycline exerts its protective action while the infected organism does not yet have antibodies against pythiosis. Therefore, the anti-inflammatory and immunomodulatory capacity of the drug favors the survival of the animal with pythiosis while preventing metastases in the organs of these animals.

Studies show that minocycline is distributed freely to the interstitial fluid, and this phenomenon is most probably due to the high lipophilicity of minocycline (Maalard et al., 2014). Thus, we hypothesize that it is relatively easy for minocycline to penetrate the tissues and to exert



**Fig. 2.** Subcutaneous injury tissue from rabbits inoculated with *P. insidiosum* that were necropsied after 70 days. **A** and **B** tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) to examine the inflammatory responses. **A** area of necrosis containing *P. insidiosum* (▼), featured as a negative control image, surrounded by infiltrating macrophages, lymphocytes, and abundant eosinophils. **B** areas with caseous necrotic (▼) content, macrophages with vacuolated cytoplasm. **C** and **D** Grocott's stain: quantification of the fungal load and inflammatory responses in the granulomatous tissue of animals infected with *P. insidiosum* using scoring system of 0 to 4. Scored 0, if no filaments were visible, or of 1 to 4 according quantity present of fungal load: rare, few, moderate and many, respectively). Magnification, x400.

its anti-inflammatory and fungistatic effects, or according to other studies, minocycline may also accumulate in tissues, validating our results (Garrido-Mesa et al., 2013).

We also favor the hypotheses of Buch et al. (2013) and other researchers (Loreto et al., 2011) stating that animals cured with immunotherapy develop a Th1 response, and sick animals develop a Th2 response. Additionally, Ledor et al. (2018) showed that the use of the immunotherapy PitiumVac® efficiently induced naive T cell differentiation into a Th1 phenotype by the activation of specific Th1 cytokine production *in vitro* in animals with pythiosis. We hypothesize that our therapeutic approach will avoid the prolonged use of antibiotics because we suspect that the mechanism of action against *P. insidiosum* is similar to that observed against bacteria, consistent with the hypothesis of Loreto et al. (2014).

## 5. Conclusion

Our study aimed to identify a satisfactory treatment for pythiosis and to establish a new treatment protocol. Our results suggest that minocycline (10 mg/kg) has fungistatic activity in rabbits infected with *P. insidiosum*, and immunotherapy (Pitium-Vac®) is an effective combination therapy option because it cured one animal during the treatment period via the development of a Th1 response.

Thus, we suggest the use of minocycline up to the thirteenth day to modulate the inflammation triggered by the infection, and treatment

with the immunotherapy from the fourteenth day until regression of the pythiosis injury. To the best of our knowledge, this study represents the first evaluation of the use of minocycline in combination with immunotherapy against *P. insidiosum* in an experimental disease model. Future studies should consider this therapeutic approach in humans and other animals, and additional pharmacological and toxicological investigations are required to determine guidelines for the evaluation of the safety and efficacy of this drug in the treatment of pythiosis.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in this manuscript either via financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence the content of this work.

## Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (grant 471221/2011-2 to J.M.S.). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. C.E.P.Z., F.P.K.J., É.S.L., K.B.S., and J.S.M.T. provided writing assistance and language editing. D.D. and S.H.A. provided assistance in scientific experiments. L.F. and J.M.S. proofread the

manuscript, and J.M.S. provided orientation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108618.

References

Agnihotri, R., Gaur, S., 2010. Chemically modified tetracyclines: novel therapeutic agents in the management of chronic periodontitis. *Indian J. Pharmacol.* 44, 161–167. <https://doi.org/10.4103/0223-7613.83841>.

Bach, R.C., Leal, D.B., Buchel, J.B., Souza, V.C., Maleni, G., Dal Pozzi, M., Schlomm, K.B., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2010. Immunotherapy for pythiosis: effect on NTPase activity in lymphocytes of an experimental model. *Biomol. Pharmacol.* 54, 718–722. <https://doi.org/10.1016/j.biomph.2010.09.018>.

Bach, R.C., Leal, D.B., Jacques, J.A., Souza, V.C., Buchel, J.B., Schlomm, K.B., Zanetta, R.A., Hochheuer, P.A., De Lima Pereira, P., Casati, E.A., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2013. E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. *Cell Biochem. Funct.* 31, 478–484. <https://doi.org/10.1002/cbf.2221>.

Castellar, F.R., Sobrinho-Júnior, C., do-Hierro-Carrazzolo, A., Herrera-Ambrosin, A., Bando-de-Sousa, A., 2017. Intracocular minocycline for the treatment of ocular pythiosis. *American An. J Health Syst Pharm* 74, 821–825. <https://doi.org/10.2146/ajph160248>.

Cunha-Ferreira, M., Gomez-Lopez, A., Alastruay-Caparrós, A., Bernal-Martinez, L., Cueto, I., Buitrago, M.J., Rodriguez-Tudela, J.L., 2010. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and East techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1762–1766. <https://doi.org/10.1128/JCM.02318-09>.

Gasota, W., Lipman, L.J., De Cock, A.W., East, T.K., Pyge, R.R., Scheuwater, J., Vilela, R., Mendonça, L., 2010. Pythium insidiosum: an overview. *Vet. Microbiol.* 146, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.019>.

Garrido-Mesa, N., Zarzuela, A., Gálvez, J., 2013. Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br. J. Pharmacol.* 169, 337–352. <https://doi.org/10.1111/bjp.12339>.

Gulati, I.M., Lee, H.M., Ryan, M.E., Giamberini, W.V., Payne, J., Sessa, T., 1998. Tetracycline inhibits connective tissue breakdown by multiple nonantimicrobial mechanisms. *Adv. Dent. Res.* 12, 12–26. <https://doi.org/10.1177/10901279980120110311>.

Intaraprasit, A., Somprachon, Y., Chantachankul, B., Chaisriya, P., Lohsom, T., Yuyyong, W., Jungsrija, N., Kermong, Y., Sanika, A., Chaisriart, A., Banyong, R., Santurio, J.M., Groeters, A.M., Ratanasumangkon, K., Krakajuan, T., 2016. Protein A/G-based immunochromatographic test for serodiagnosis of pythiosis in human and animal subjects from Asia and Americas. *Med. Mycol.* 54, 641–647. <https://doi.org/10.1093/mic/mey016>.

Haupt, S.R., Verdi, C.M., Tondello, J.S., De Lenc, T.S., Alves, S.H., Santurio, J.M., Loreto, E.S., 2016. In vitro synergism between azithromycin or tobramycin and topical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 5023–5025. <https://doi.org/10.1128/AAC.00134-16>.

Jesus, F.P.R., Loreto, E.S., Ferreira, L., Alves, S.H., Driemeier, D., Souza, E.O., França, R.T., Lopes, S.T.A., Pimenta, M.B., Ludwig, A., Azevedo, M.I., Ribeiro, T.C., Tondello, J.S.M., Santurio, J.M., 2016. In vitro and in vivo antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin, or tigecycline against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 5023–5025. <https://doi.org/10.1128/AAC.00134-16>.

Klippenburg, M., Beersveld, F.C., Therswell, J., Mallon, C., Dijkman, B.A.C., 1994. Minocycline in active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 37, 629–636. <https://doi.org/10.1002/art.1790370908>.

Krakajuan, T., Kaphatayavong, B., Pocharktan, R., Nityayusit, P., Leelachaiwal, P.,

Wanichwatanawit, W., Chaisriart, A., Assanum, P., Saipetch, M., Mornikapan, P., Chantachankul, P., Lekhakula, A., Mitaman, W., Kalaosuwakul, S., Suppanitayapa, K., Chaiwarith, R., Chiewcharvit, S., Tansawat, N., Sriat, S., Saundkratay, C., Kulsichit, W., Wongpauwan, M., Sontkarn, S., 2006. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin. Infect. Dis.* 43, 568–576. <https://doi.org/10.1093/cid/cjg353>.

Krakauer, T., Buckley, M., 2003. Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3630–3633. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3630-3633.2003>.

Ledur, P.C., Tondello, J.S.M., Jesus, F.P.R., Verdi, C.M., Loreto, E.S., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2018. Dendritic cells pulsed with *Pythium insidiosum* (1,3 $\alpha$ )-D-glucan, heat-inactivated spores and immunotherapy prime naive T cells to Th1 differentiation in vitro. *Immunobiology.* 223 (3), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.003>.

Leekachitrat, T., Sangsakul, A., Lohsom, T., Yuyyong, W., Rajrajawat, T., Krakajuan, T., 2017. Evolution of the viral biosynthetic pathway of *Pythium insidiosum* and related mycetes contributes to antifungal drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e02352–e02316. <https://doi.org/10.1128/AAC.02352-16>.

Loreto, E.S., Marín, D.A.N., Denardi, I.B., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2011. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3568–3569. <https://doi.org/10.1128/AAC.02586-10>.

Loreto, E.S., Tondello, J.S.M., Pimenta, M.B., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2014. New insights into the in vitro susceptibility of *Pythium insidiosum*. *AAC* 58, 7524–7527. <https://doi.org/10.1128/AAC.02680-13>.

Mauland, M.G., Guerdahmet, I., Papich, M.G., 2014. Minocycline pharmacokinetics and pharmacodynamics in dog dosage recommendations for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infections. *Vet. Dermatol.* 25(<https://doi.org/10.1111/vde.12130>), 182–e87.

Matsu, S., Ohi, Y., Sanada, A., Tanishichi, H., Hagiwara, S., Makimura, K., Nishida, K., 2019. Successful medical management of *Pythium insidiosum* keratitis using a combination of minocycline, itraconazole, and chloramphenicol. *Am. J. Ophthalmol. Case Rep.* 13, 100498. <https://doi.org/10.1016/j.ajoc.2019.100498>.

Mendonça, L., Newton, J.C., 2005. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Med. Mycol.* 43, 477–486. <https://doi.org/10.1080/13653050500270882>.

Pereira, D.J., Santurio, J.M., Alves, S.H., Argente, J.S., Cavalcanti, A.S., Ferreira, L., 2008. Zoonoprophylaxe in vitro contra insaladas de oocistos *Pythium insidiosum*. *Cien. Rev.* 38, 143–147. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000140023>.

Pongpudung, N., Wornalichai, N., Ploingla, R., Upeola, S., Sangsankon, A., Paitumpung, L., Mendonça, L., Chindamporn, A., 2015. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1885–1892. <https://doi.org/10.1093/ajoc/dvz008>.

Santos, C.E.P., Marques, L.C., Zanetta, R.A., Jesus, F.P.R., Santurio, J.M., 2011. Does immunotherapy prevent relapses from the reinfection by the oocysts *Pythium insidiosum*? *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1307–1309. <https://doi.org/10.1128/CVI.00130-11>.

Santurio, J.M., Leal, A.T., Leal, A.B.M., Ferragutti, B., Lubick, I., Gallo, E.S.V., Capetti, M.V., Alves, S.H., Ferreira, L., 2003. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosa developed and evaluated. *Vaccine* 21, 2535–2540. [https://doi.org/10.1016/S0264-4108\(03\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0264-4108(03)00125-5).

Santurio, J.M., Leal, A.T., Leal, A.B.M., Alves, S.H., Lubick, I., Grubelic, J., Capetti, M.V., 2006. Indirect ELISA for the serodiagnosis of pythiosis. *Pesqui. Vet. Bras.* 26, 47–50. <https://doi.org/10.1590/S0100-73612006000500010>.

Sapich, N.A., Phichitkrong, R., 2006. Tetracycline: antimicrobial properties and their clinical implications. *J. Am. Acad. Dermatol.* 54, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.10.014>.

Sudjettrak, T., Sriwanthana, V., 2011. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. *BMC Infect. Dis.* 11, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2284-11-33>.

Voit, A.S., Evans, M.E., Lavo, M.T., Schwan, R.J., Rupp, R.P., 2005. Use of macrolides and tetracyclines for chronic inflammatory diseases. *Ann. Pharmacother.* 39, 86–94. <https://doi.org/10.1345/aph.12282>.

## 5.2 MANUSCRITO 1

### **5.2.1 E-NTPDASE, E-5'-NT and E-ADA activities in platelets of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy and minocycline.**

Manuscrito submetido para a Revista *Cell Biochemistry and Function*, conforme anexo 2.

**E-NTPDASE, E-5'-NT and E-ADA activities in platelets of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy and minocycline.**

*Running title: Purinergic system in platelets P. insidiosum-infected*

Carine E. P. Zimmermann<sup>1</sup>; Francielli P. K. de Jesus<sup>1</sup>; Karine B. Schlemmer<sup>1</sup>; Livia G. Castilhos<sup>1</sup>; Juliana S. M. Tondolo<sup>1</sup>; Érico S. Loreto<sup>1</sup>; Aline Ludwig<sup>1</sup>; Daniela B. R. Leal<sup>1</sup>; Sydney H. Alves<sup>1</sup>; Laerte Ferreiro<sup>2</sup>; Janio M. Santurio<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria;

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;

**#Address for correspondence:**

Janio M. Santurio - [janio.santurio@gmail.com](mailto:janio.santurio@gmail.com)  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia

Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, Sala 4139  
Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brasil.  
Tel./fax: +55 55 3220-8906.

**Abstract**

This study aimed to evaluate the activity of the enzymes E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-adenosine deaminase (E-ADA) in platelets from rabbits inoculated with *P. insidiosum* and treated with immunotherapy and minocycline. Twenty five rabbits, aged three months old and subcutaneously inoculated with *Pythium insidiosum* zoospores were divided into five groups (n=5): treated with minocycline (10 mg/kg/day twice daily), treated with immunotherapy (34 mg subcutaneously every 14 days), treated with minocycline plus immunotherapy, and untreated and healthy group. The treatments were started 30 days after inoculation, by 70 weeks, and only in the rabbits that developed lesions. The infected and untreated group differed significantly increased in relation to the healthy group only in the hydrolysis of ADP and AMP. The results too showed that E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities were decreased in the immunotherapy-treated groups, which consequently increased the extracellular concentration of extracellular ATP, ADP and AMP. E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities were decreased in the immunotherapy-treated groups and they were increased in the isolated minocycline-treated group. The enzymes activities were decreased in the treatment association minocycline plus immunotherapy-treated. E-ADA activity did not change in the context of infection with the oomycete. Our results reiterate the hypothesis of purinergic system receptor involvement in the modulation of immune response also for platelets, and that the nucleotides and adenine nucleoside interact for modulation of the Th1 response to occur.

**Keywords:** *Pythium insidiosum*; platelets; E-NTPDase; E-5'-nucleotidase; E-adenosine deaminase;

## 1. Introduction

Purinergic signaling system plays an important regulatory role in inflammation, cellular activation, blood flow, and vascular thrombosis by extracellular biomolecules. The purinergic system is composed of three main components: adenine nucleotides, adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) and its nucleoside adenosine (ADO), receptors and ectoenzymes (YEGUTKIN, 2008). ATP and or ADP regulate hemostasis and thrombosis via activation and aggregation of platelets at sites of vascular injury and mediate several inflammatory responses, including the release of the cytokines, tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  (ZIMMERMANN et al., 2012; BURNSTOCK, 2016).

These extracellular molecules (ATP and ADP) interact with their cell surface receptors, effects are mediated through G-protein-coupled P2Y receptors as well as via 'cytolytic' P2X7 and other P2X receptors with intrinsic pore-forming activity, and type P1 is responsive to adenosine (DI VIRGILIO, 2001; YEGUTKIN et al., 2002; SCHETINGER et al., 2008). The duration and magnitude of purinergic signalling is governed by nucleotide-degrading ectoenzymes that are anchored to the cell surface and are found in many cell types, such as lymphocytes (LEAL et al., 2005) and platelets (PILLA et al., 1996; LUNKES et al., 2003).

E-NTPDase (CD39, ecto-apyrase, ATP diphosphohydrolase, EC 3.6.1.5) is a glycosylated, member of the ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase family, converts ATP and ADP into AMP, whereas E-5'-nucleotidase (E-5'-NT; CD73; EC 3.1.3.5) converts AMP into ADO (ELTZSCHIG et al., 2003). Adenosine levels are controlled by adenosine kinase (AK), which rephosphorylates adenosine, and by E-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4) which converts adenosine into inosine (FRANCO et al., 1998).

It is already known that the enzymes of the purinergic system are involved in the signaling of several diseases, as well as, with the therapeutic potential (LEAL et al., 2005; BURNSTOCK; KNIGHT; GREIG, 2012; JARVIS, 2019). In pythiosis, for example, the interaction with purinergic receptors would provoke a Th1 response pattern resulting in the decrease of lesions (BACH et al., 2010). Pythiosis is a disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*, a fungus-like aquatic organism that inhabits swampy areas, causative agent of pythiosis that affects the human and animals, particularly horses (GAASTRA et al., 2010).

Pythiosis is a chronic and piogranulomatous disease and does not yet have a complete knowledge about the mechanisms involved in infection (SANTURIO et al., 2006a). Successful resolution of pythiosis with antifungal treatment alone is difficult due to *Pythium* spp. cell wall and cytoplasmic membrane compositions are devoid of ergosterol, the target of most antifungal drugs (GROOTERS, 2003; LERKSUTHIRAT et al., 2017).

Pitium-Vac® immunotherapeutic is an agent prepared from the mycelial mass of *P. insidiosum*, has been successfully used in the treatment of equine pythiosis, and a cure rate between 70 and 80% is achieved (MORAES et al., 2013). However, this therapeutic approach provides a curative but not protective response because reinfections were reported (SANTOS et al., 2011).

Due to the fact that the etiologic agent has different morphological characteristics from true fungi, therapeutic strategies using antibiotic drugs, such as minocycline, have shown good results (LORETO et al. 2014; RAMAPPA et al., 2017). Studies have shown that minocycline exerts fungistatic activity on oomycete and which influenced the cure or survival of rabbits with pythiosis infected experimentally (JESUS et al., 2016; ZIMMERMANN et al., 2020).

Taking into account the importance of ecto-enzymes activities in the maintenance of hemostasis and the in immunoregulation, this study aimed investigate the participation of the purinergic system, through the activity of the E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-adenosine deaminase enzymes in platelets of rabbits inoculated with *P. insidiosum* treated with immunotherapy and minocycline.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Chemicals**

The substrates adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), 5'-monophosphate sodium salt (AMP), thymidine 5'-monophosphate p-nitrophenyl ester sodium salt (p-Nph-5'-TMP), adenosine, as well as bovine serum albumin, Trizma base, HEPES and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  was purchased from Reagen and Tetrabutylammonium chloride from Merck (Darmstadt, Germany). All the other chemicals used in this experiment were of analytical grade and of the highest purity.

## 2.2 *Pythium insidiosum*

The clinical isolate of *P. insidiosum* used to induce experimental pythiosis (isolate 290) was genotyped and registered under the GenBank accession number KJ176713, according to Jesus et al. (2016).

## 2.3 Zoosporogenesis

Ten pieces of *Paspalum notatum* grass, approximately 2 centimeters in length, were autoclaved, distributed over *P. insidiosum* cultures, and incubated at 37°C for 24 h (SANTURIO et al., 2003). Pieces of infected grass were transferred to an induction medium that contained the following: solution 1: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 M (Vetec®, Rio de Janeiro, Brazil), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 M (Vetec®), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 3.66 M (Vetec®), and 500 ml of distilled water; solution 2: MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.5 M (Vetec®), CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.5 M (Vetec®), and 250 ml of distilled water. The final induction medium composition was 0.5 ml of solution 1 and 0.1 ml of solution 2 in 1000 ml of sterile distilled water. Induction medium containing pieces of grass infected with *P. insidiosum* was incubated at 37°C for 8 h. Pieces of grass were observed by microscopy, and zoospores were counted using a Neubauer chamber.

## 2.4 Animals and treatment

The rabbits New Zealand were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Santa Maria (UFSM) with aged three months old and were kept in a temperature range of 16-22°C and 60-65% relative humidity; they received 100 g of commercial food for rabbits, vegetable fiber and water *ad libitum*. The animals The Ethics Committee on Animal Experiments of UFSM approved all the animal procedures (protocol number: 055/2012).

The rabbits were subcutaneously inoculated with *P. insidiosum* with 17.500 zoospores and were checked weekly, and the subcutaneous nodular area (cm<sup>2</sup>) was measured using a sliding caliper when nodules were present. Nodular development was evaluated 30 days after inoculation. After the animals were divided into five groups (n=5); treated with minocycline (PharmaNostra® Rio de Janeiro, Brazil) (10 mg/kg/day twice daily by oral administration), Pitium-Vac® immunotherapy (34 mg subcutaneously every 14 days), minocycline plus immunotherapy, control group infected and healthy control group. ELISA was used to confirm the early diagnosis of

*P. insidiosum* infection prior to nodule development, as described by Santurio et al. (2003; 2006).

The immunotherapy started to be administered subcutaneously on the 30<sup>th</sup> day after inoculation in the distal region opposite to the zoospore injection site. This procedure was repeated every 14 days for a total of four injections. The treatment with minocycline was based on the *in vitro* and *in vivo* susceptibility results reported by Jesus et al. (2016). The animals were treated for ten week after the development of lesions, with minocycline PharmaNostra® 10 mg/kg/day twice daily by oral administration and Pitium-Vac® immunotherapy 34 mg subcutaneously every 14 days.

## **2.5 Preparation of biological samples**

At the end of the experiment, all surviving animals were euthanized through deepening of anesthesia using thiopental (Thiopentax® Cristália, São Paulo, Brazil) (60 mg/kg), and the blood was collected by puncture of the femoral and transferred to the vacuum tubes with sodium citrate 3.5% (BD Vacutainer®, Brazil).

## **2.6 Cellular integrity**

The integrity of the platelet preparation was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity in intact and disrupted platelets using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer). The procedure was repeated before and after the incubation period. The protocol was carried out according to the manufacturer's instructions. Triton X-100 (1 %, final concentration) was used to disrupt the platelet preparation. The enzymatic activity is expressed as units per liter, and one unit (1U) corresponds to 1  $\mu$ mol of NADH formed per minute per liter.

## **2.7 Platelet preparation**

Platelets were prepared by the method of Pilla et al. (1996) modified by Lunkes et al. (2003). Briefly, peripheral blood was collected in 0.129 M sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 160 $\times$ g for 15 min. Afterwards, the PRP was centrifuged at 1,400 $\times$ g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl, and 5.5 mM glucose. The washed

platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer and protein was adjusted to 0.4-0.6 mg/mL.

### **2.8 E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities determination**

E-NTPDase enzymatic assay in platelets was carried out in a reaction medium containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200  $\mu\text{L}$  as described by Lunkes et al. (2003). For AMP hydrolysis, the 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, except that the 5 mM  $\text{CaCl}_2$  was replaced by 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Twenty microliters of the enzyme preparation (8-12  $\mu\text{g}$  of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1mM, and AMP at a final concentration of 2 mM, and the time of incubation was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by method of Chan, Delfert, Junger (1986) using malachite green as the colorimetric reagent and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as standard. Controls were carried out to correct for nonenzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

### **2.9 Adenosine deaminase activity determination (E-ADA)**

E-ADA activity from platelets was determined according to Giusti and Galanti (1984), which is based on the direct measurement of the formation of ammonia, produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to between 0.7 and 0.9 mg/mL. Results were expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

### **2.10 Protein determination**

Protein content was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard. This assay is based on

the binding of the dye Coomassie Blue G-250 to protein, and this binding is accompanied by measuring the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

### 2.11 Statistical analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (S.D). Statistical analysis were performed using Sigma Plot software version 12.5, and one-way ANOVA was performed. Significant differences were considered at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Cellular integrity

After thirty days the rabbits-infected were treated. During the experiment two animals died in the pythiosis group, one animal in the sixth week and the other in the ninth week. Necropsies indicated that their death was caused by pythiosis metastases in the lungs and kidneys.

LDH activity measurement showed that approximately 5% of the platelets of both groups were disrupted, indicating that the preparation was predominantly intact after the isolation procedure (Data not shown).

### 3.2 E-NTPDase activity

Rabbits with lesions characteristic of pythiosis showed alterations in ATP hydrolysis. Compared to the healthy group (HC =  $29,75 \pm 4,09$  nmol Pi/min/mg protein) with the pythiosis control (PC =  $28,19 \pm 3,02$  nmol Pi/min/mg protein), revealed that the group with lesions (PC) wasn't significantly different compared to the group without lesions (HC) (Fig. 1A). And comparing with the other groups with pythiosis and who received treatment, Pitium-Vac® (PVAC =  $23,73 \pm 3,60$  nmol Pi/min/mg protein), minocycline treatment (MIN =  $20,97 \pm 3,72$  nmol Pi/min/mg protein) and treatment association (PVAC+MIN =  $15,12 \pm 2,94$  Pi/min/mg protein) there was a significant decrease in enzyme activity E-NTPDase.

In the hydrolysis of ADP in platelets (Fig. 1B) post hoc analysis with the revealed that the group PC ( $15,72 \pm 1,28$  Pi / min / mg protein) was significantly different compared to the group HC ( $11,74 \pm 1,83$  Pi / min / mg protein), apresented progressive increase in enzymatic activity, and consequent increase hydrolysis of ADP. The hydrolysis of ADP in platelets presented a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in the groups that were treated with immunotherapy (PVAC =  $5,64 \pm 1,07$  Pi/min/mg

protein, and PVAC + MIN =  $4,84 \pm 1,61$  Pi / min / mg protein), when compared with the other MIN ( $14,97 \pm 1,88$  Pi / min / mg protein), PC and HC groups.

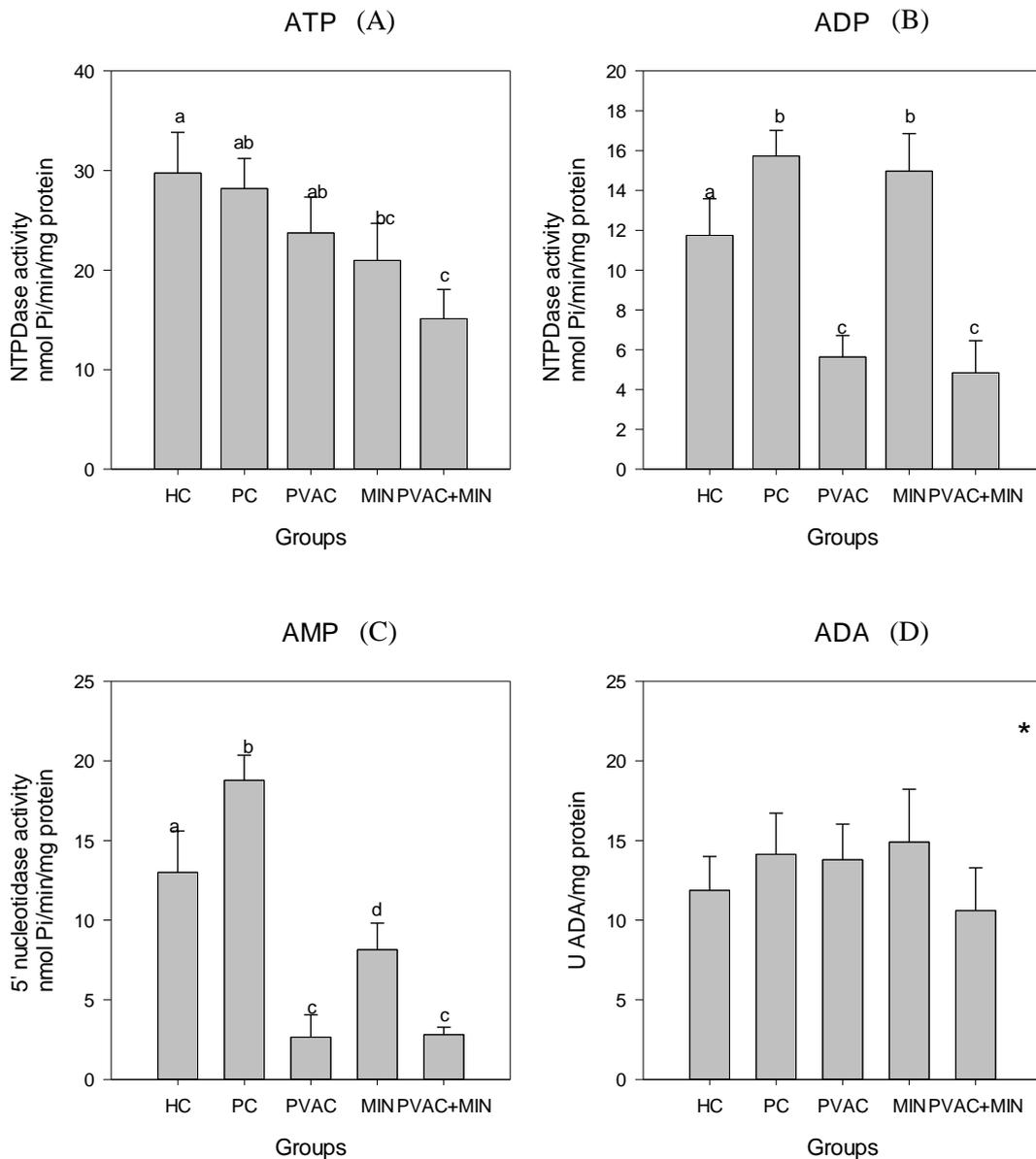
### 3.3 E-5' nucleotidase activity

Figure 1C demonstrates that hydrolysis of AMP in platelets treated rabbit revealed that increase of E-5'-NT enzymatic activity to PC group ( $18,78 \pm 1,57$  nmolPi / min / mg protein) was significantly different ( $P < 0,05$ ) compared to the HC group ( $13,00 \pm 2,59$  nmolPi / min / mg protein). And comparing with the other groups with pythiosis who received treatment, PVAC, MIN and PVAC + MIN ( $2,65 \pm 1,39$ ;  $8,15 \pm 1,66$ ;  $2,81 \pm 0,47$  nmol Pi / min / mg protein, respectively,  $P < 0,05$ ) was significantly reduced in relation to HC and PC group.

### 3.3 E-ADA activity

The results obtained for adenosine deamination by E-ADA activity in platelets of PC group ( $14,13 \pm 2,58$  U ADA / mg protein) and HC group ( $11,87 \pm 2,12$  U ADA / mg protein) did not present significant statistical differences ( $P > 0,05$ ), in the same way as the groups treated with MIN group ( $14,90 \pm 3,32$  U ADA/mg protein) and PVAC group ( $13,79 \pm 2,23$  U ADA/mg protein) as well as the association between them (PVAC+MIN =  $10,60 \pm 2,68$  U ADA/mg protein), represented in Figure 1D.

**Figure 1.** Effect of immunotherapy (Pitium-Vac<sup>®</sup> - PVAC), minocycline (MIN), and PVAC+MIN on NTPDase (ATP (A) and ADP (B)), 5'nucleotidase (AMP (C)) and E-ADA (D) activities on rabbits platelets. Data are presented as mean  $\pm$  SD. HC = Healthy Control; PC = Pythiosis control; n = 5. Groups that share different letters are statistically different ( $P < 0,01$ ). \* No significant difference between groups was observed ( $P > 0,05$ ).



#### 4. Discussion

Our study evaluated the purinergic system through the activity of ectoenzymes in the hydrolysis of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and adenosine nucleoside in *P. insidiosum*-infected rabbits platelet samples and that they also received treatment with immunotherapy the Pitium-Vac® and minocycline, and the association. Several studies have shown changes in adenine nucleotide hydrolysis in various pathological conditions, including cancer (SITKOVSKY, 2008; ZHANG, 2010), chagas disease (SOUZA et al., 2012), parasitological diseases (OLIVEIRA et al., 2012), but few studies related to pythiosis.

The present study was developed from a preparation containing 95% intact platelets, and the activities of the ectoenzymes E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA were measured from platelets of rabbits. These results reinforce the close relationship between pithiosis and the purinergic system as reported by Bach et al. (2010) and Bach et al. (2012) that proposed that there is an involvement, based on ecto-enzymes of lymphocytes, which would also regulate the immune response in the host.

Our results showed a significant reduction of ATP hydrolysis in platelets of rabbits with pythiosis possibly followed by an increase in the extracellular concentration of ATP. ATP release is a consequence of damage host cells, to the product of inflammatory cell activation being a process closely involved with immunity (DOSCH et al., 2018). According Burnstock (2016) there is ATP release from injured cells, resulting in the inflammatory response through increased synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub>, consequently occurs binding to the P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> cell receptors during acute inflammation (BODIN; BURNSTOCK, 1998). This extracellular situation configures stimulation of Th<sub>1</sub> immunity and could be involved in oomycete destruction.

In addition, minocycline for having immunomodulatory activity, when analyzed in isolation, may be contributing to avoid activation of inflammatory molecules and when used in combination with immunotherapy, it may be acting together with the destruction of the agent. Corroborating, Kalish and Koujak (2004) suggested a new immunosuppressive mechanism for minocycline, in tetanus toxoid, being the minocycline inhibits antigen processing of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) proliferation at therapeutic concentrations and that the minocycline has potential for the treatment of CD4<sup>+</sup> T cell mediated (e.g., HLA-DR linked) autoimmune conditions such as rheumatoid arthritis, or multiple sclerosis. Studies show that minocycline also acts on metalloproteinases (MMP) present on the surface of platelets, being important at the time of inflammation in the presence of *P. insidiosum* (THOMAS, 2003).

Furthermore, according Zimmermann (2001) the molecule of ATP can act as cosubstrate for others ectoenzymes, besides of NTPDase, as ectoprotein kinases, resulting in the production of phosphoprotein and ADP. In addition, there is on the platelet surface the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP), which also catalyze the hydrolysis of ATP and ADP, forming AMP. This probably

could justify our results. A similar study performed by Nakaar *et al* (1998) pointed that ATP is hydrolyzed to AMP by recombinant *Toxoplasma gondii* NTPase1 with little accumulation of ADP. In disagreement, recombinant NTPase3 hydrolyzes ATP rapidly to ADP but degrades it only slowly to AMP, this is due to the fact that these enzymes share 97% of their amino acids.

Ours results demonstrates an increase in the E-NTPDase activity when used ADP substrate during the infection and minocycline treatment. Probably, infection induces an increase in platelet ADP hydrolysis inhibiting platelet aggregation and limiting thrombus formation. The treatment with immunotherapy was able to decrease the enzymatic activity, which leads us to believe that there was an increase of extracellular ADP. ADP is the most important promoter of platelet aggregation, whereas adenosine is a powerful inhibitor of this process. The increase of ADP in the extracellular medium may also lead to a pro-inflammatory reaction, mainly by the release of pro-inflammatory mediators, as tumor necrosis factor  $\alpha$ , IL-12, IL-1b and reactive oxygen species which collaborate for the induction of an immune response Th<sub>1</sub> that could be corroborated with an invading agent destroyer (YEGUTKIN, 2008).

When ATP and ADP concentrations are high in the extracellular medium, their effects will be provided by binding to the P<sub>2</sub>X purinoreceptors which are expressed in the target cell, activating pro-inflammatory cytokine production and triggering a Th<sub>1</sub> response. In contrast, second Bours *et al.* (2006), low concentrations of extracellular ATP and ADP possess affinity for P<sub>2</sub>Y purinoreceptors, which stimulate the Th<sub>2</sub> immune response, as it was also stated by Di Virgilio, Boeynaems and Robson (2009). In addition, Golub *et al.* (1991) affirm that minocycline may also contribute by a non-antimicrobial mechanism, but through anti-collagenase and anti-inflammatory activity. Giuliani, Hader and Yong (2005) state that minocycline has a direct effect on the reduction of TNF- $\alpha$ , IL-1 and metalloproteinases, which we believe to contribute to the Th<sub>2</sub> response.

The pathogenesis of *P. insidiosum* infection and the immune response is a large challenge. Many studies speculate to complement the hypothesis proposed by Mendoza and Newton (2005), according with them, host immune response to natural *P. insidiosum* infection is based on Th<sub>2</sub> response with eosinophilic inflammation and release of IL-4 and IL-5 associated with disease progression and chronification. It has been speculated that the most likely explanation for the curative properties of

immunotherapy would be switch a Th<sub>2</sub> to a Th<sub>1</sub> response pattern (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

Our study also showed high E-5'-NT activity in infected rabbits and decrease in E-5'-NT activity in the rabbits treated with the immunotherapy and minocycline, consequently also altering the hydrolysis of extracellular AMP. The increased E-5'-NT activity in platelets also was observed by Souza et al. (2012) and Fretes et al. (1999) in platelets of Chagas disease patients and heart myocytes from acutely *T. cruzi*-infected mice, respectively. Fretes et al. (1999) suggested that the increased activity can be caused by hypoperfusion conditions during *T. cruzi* infection, leading to the production of adenosine, a cardioprotective substance.

Our study suggested that possible increase in extracellular AMP levels contributes to the induction of a Th<sub>1</sub> response. According to Mendoza and Newton (2005) host immune response to natural *P. insidiosum* infection is based on Th<sub>2</sub> response with eosinophilic inflammation and release of interleukin (IL)-4 and IL-5 associated with disease progression and chronification. It has been speculated that the most likely explanation for the curative properties of immunotherapy would be switch a Th<sub>2</sub> to a Th<sub>1</sub> response pattern (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

Corroborating with this suggestion, Borowiec et al. (2006) affirm that high AMP levels, serve as substrate for the production by catalytic activity of E-5'-NT of adenosine, which presents anti-inflammatory properties as well as thromboregulatory effects (BOROWIEC et al., 2006). The adenine nucleotides and adenosine are released from cells to extracellular medium during infection and inflammatory process and act modulating vascular response, through purinergic receptors (SOUZA et al., 2012). Furthermore, the adenosine exerts its potent effect anti-inflammatory and immunosuppressive actions through binding with P<sub>1</sub> receptors (FREDHOLM et al., 2001; BACH et al., 2013).

In addition to the enhancement of E-NTPDase and E-5'-NT activities in group PC, no changes were observed E-ADA activity among the groups (PC, HC, MIN, PVAC and MIN+PVAC) in this study, which indicate that adenosine nucleoside is present in physiological levels in the extracellular medium. This is positive because this nucleoside is widely recognized as an immunosuppressive molecule and can thus be cause, when present in high particles, a marked cellular immunosuppression. Corroborating one hypothesis, Dwyer (2007) states that increased adenosine, as well as ATP, in response to tissue damage, is commonly seen in acute processes.

And, Di Virgilio (2007) states that purinergic signaling also impacts chronic inflammatory processes, as cell proliferation, differentiation and apoptosis (DI VIRGILIO, 2007). Then, after the progression of the immune response, nucleotide-mediated purinergics may become immunomodulatory in response to microenvironmental signals according to the tissue in which the response occurs (JACOB et al., 2013). Likewise, the minocycline can act modulating through of the inhibits the production of mediators of inflammation, such as inducible nitric oxide synthase and MMP. Furthermore, another factor to be considered is the pharmacokinetics of minocycline permitted strong affinity for tissue and could be influencing the response to treatment (GIULIAN; HADER; YONG, 2005).

In this context, the importance of measuring the enzymes located on the surface of platelets facilitates the transfer of information to the different sites of the organism, since the platelets are numerous and mobile and interacting with each other and with other blood cells, during its useful life. Thus, it is believed that platelets also interact with invading fungi at different stages of infection and also at different sites in the body and influence thrombogenic function. In the same way that fragments of hyphae can rupture and circulate in the bloodstream, giving rise to greater dissemination (SORGO et al., 2013; GIRARD et al., 2013).

According Marcus et al. (2003) and Bours et al. (2006) the platelets interact with invading fungi at different stages of the infection and also at different sites of the body (MARCUS et al., 2003; BOURS et al., 2006). In this sense, our results reinforce those reported by Bach et al. (2013) and reinforce the importance of the purinergic system in the modulation of the immune response during *P. insidiosum* infection and treatment with associated minocycline and Pitium-Vac®. Furthermore, our study suggests the direct involvement of the purinoreceptors in the course of the disease and in the immune modulation of the host.

## 5. Conclusion

In conclusion, it is observed participation of some enzymes the purinergic system, as E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA during the *P. insidiosum* infection and in the proposed treatments. We suggest that the treatments with minocycline and immunotherapy are capable of reversing the signs developed by the infection about the size of the lesions and disease progression, as so recently the present group of authors published.

Our results reiterate the hypothesis of receptor involvement in the modulation of the immune response also for platelets. In addition, our hypothesis is that there is an influence of adenosine on platelet regulation, preventing the formation of thrombus after the use of Pitium-Vac®, as a possible chronic response of sick. And instigates the search for more investigations of cellular markers that may be influencing the immunological response of treatment with the immunotherapy.

### **Conflicts of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest in this manuscript either via financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence the content of this work.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (grant 471221/2011-2 to J.M.S.). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. C.E.P.Z., F.P.K.J., É.S.L., K.B.S., and J.S.M.T. provided writing assistance and language editing. D.B.R.L, A.L., L.G.C. and S.H.A provided assistance in scientific experiments. L.F. and J.M.S. proofread the manuscript, and J.M.S. provided orientation.

### **References**

BACH, B.C.; LEAL, D.B.; RUCHEL, J.B.; SOUZA, V.C.; MABONI, G.; DAL POZZO, M.; SCHLEMMER, K.B.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. *Biomed. Pharmacother.*, v. 64, p. 718-22, 2010.

BACH, B.C.; LEAL, D.B.; JAQUES, J.A.; SOUZA, V.C.; RUCHEL, J.B.; SCHLEMMER, K.B.; ZANETTE, R.A.; HECKTHEUER, P.A.; DE LIMA PEREIRA, P.; CASALI, E.A.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. *Cell Biochem. Funct.*, v. 31, p. 476-81, 2013.

BOROWIEC, A.; LECHWARD, K.; TKACZ-STACHOWSKA, K.; SKLADANOWSKI, A.C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim. Pol.*, v. 53, p. 269-278, 2006.

BOURS, M.J.; SWENNEN, E.L.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.N.; DAGNELIE, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.*, v. 112, p. 358-404, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. Cellular distribution and functions of P<sub>2</sub> receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.*, v. 240, p. 31-304, 2004.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E.; GREIG, A.V. Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *J. Invest. Dermatol.*, v. 132, n. 3 Pt 1, p. 526-46, 2012.

CHAN, K.M.; DELFERT, D.; JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> stimulated ATPase activity. *Anal Biochem.*, v. 157, p. 375-80, 1986.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 65, n. 2, p. 232-60, 2001.

DI VIRGILIO, F.; BOEYNAEMS, J.M.; ROBSON, S.C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol.*, v. 9, p. 507-513, 2009.

DI VIRGILIO, D. Liaisons dangereuses: P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> and the inflammasome, *TRENDS. Pharmacol. Sci.*, v. 28, n. 9, 465-472, 2007.

DOSCH, M.; GERBER, J.; JEBBAWI, F.; BELDI, G. Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 18, n. 19, p. 4, 2018.

ELTZSCHIG, H.K.; IBLA, J.C.; FURUTA, G.T.; LEONARD, M.O.; JACOBSON, K.A.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S.C.; COLGAN, S.P. Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A<sub>2</sub>B receptors. *J. Exp. Med.*, v. 5, p. 783-796, 2003.

FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LUIS, C.; BLANCO, J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.*, v. 161, p. 27-42, 1998.

FREDHOLM, B.B.; IRENIUS, E.; KULL, B.; SCHULTE, G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 61, p. 443-448, 2001.

FRETES, R.E.; PAGLINI, P.; FERNÁNDEZ, A.R.; ENDERS, J.; FABRO, S.P. *Trypanosoma cruzi*: increased 5'-nucleotidase activity associated with dysfunction of adrenergic receptors in acutely infected albino Swiss mice. *J. Parasitol.*, v. 85, p. 970-972, 1999.

GIRARD, V.; DIERYCKX, C.; JOB, C.; JOB, D. Secretomes: the fungal strike force. *Proteomics*, v. 13, p. 597-608, 2013.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Colorimetric Method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim. p. 315-323, 1984.

JACOB, F.; NOVO, C. P.; BACHERT, C.; CROMBRUGGEN, K.V. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal.*, v. 9, n. 3, p. 285-306, 2013.

DWYER, K.M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; STROM, T.B.; ROBSON, S.C. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.*, v. 3, p. 171-180, 2007.

JARVIS, M.F. Therapeutic potential of adenosine kinase inhibition-Revisited. *Pharmacol. Res. Perspect.*, v. 22, n. 7(4), e00506, 2019.

LEAL, D.B.R.; STREHER, C.A.; NEU, T.N.; BITTENCOURT, F.P.; LEAL, C.A.M.; SILVA, J.E.P.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase;CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1721, p. 9-15, 2005.

LUNKES, I.G.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORCH, A.; MORCH, M.V.; MAZZANTTI, M.C.; SCHETINGER, M.C.R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb. Research*, v. 109, p. 189-194, 2003.

MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, W. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine*, v. 21, p. 2797-804, 2003.

MENDOZA, L.; NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Medical Mycology*, v. 43, n. 6, p. 477-86, 2005.

MORAES, A. S.; SANTURIO, J. M.; TOMICH, T. R.; ABREU, U. G. P.; JULIANO, R. S.; FERNANDES, F. A. Pitium-Vac® imunoterápico contra pitiose equina. In *Impactos Econômicos, Sociais e Ambientais de Tecnologias da Embrapa Pantanal* (1st ed.). Corumbá: Embrapa Pantanal. 2013.

NAKAAR, V.; BECKERS, C.J.M.; POLOTSKY, V.; JOINER, K.A. Basis for substratespecificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphatehydrolase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 97, p. 209-220, 1998.

OLIVEIRA, C.B.; SILVA, A. S. DA; SOUZA, V.C.G.; COSTA, M.M.; JAQUES, J.A.S.; LEAL, D.B.R.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S.G. NTPDase activity in lymphocytes of rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Parasitology*, v.139, p. 232-236, 2012.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets*, v.7, p. 225-230, 1996.

SANTOS, C.E.P.; MARQUES, L.C.; ZANETTE, R.A.; JESUS, F.P.K.; SANTURIO, J.M. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 18, n. 8, p. 1397-1399, 2011.

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

SITKOVSKY, M.V.; KJAERGAARD, J.; LUKASHEV, D.; OHTA, A. Hypoxia adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin. Cancer Research*, v. 14, p. 5947-5952, 2008.

SORGO, A.G.; HEILMANN, C.J.; BRUL, S.; DE KOSTER, C.G.; KLIS, F.M. Beyond the wall: *Candida albicans* secret(e)s to survive. *FEMS Microbiol. Lett.*, n. 338, p. 10-17, 2013.

SOUZA, V. do C.G.; SCHLEMMER, K.B.; NOAL, C.B.; JAQUES, J.A.S.; BAGATINI, M.D.; PIMENTEL, V.C.; CARLI, L.F.; LEAL, C.A.M.; FLECK, J.; MORETTO, M.B.; SCHETINGER, M.R.C.; LEAL, D.B.R. Purinergic system ectoenzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. *Purinergic Signal.*, v. 8, n. 4, p. 753-762, 2012.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1783, p. 67-694, 2008.

ZHANG, B. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Research*, v. 70, n. 16, p. 6407-6411, 2010.

ZIMMERMANN, C.E.P.; JESUS, F.P.K.; SCHLEMMER, K.B.; LORETO, E.S.; TONDOLO, J.S.M.; DRIEMEIER, D.; ALVES, S.H.; FERREIRO, L.; SANTURIO, J.M. *In vivo* effect of minocycline alone and in combination with immunotherapy against *Pythium insidiosum*. *Veterinary Microbiology*, v. 243, n. 108616, p. 1-5, 2020.

## 6 DISCUSSÃO

A patogênese da infecção por *P. insidiosum* e a resposta imune são um grande desafio. Com o intuito de compreender melhor esse mecanismo, o presente estudo investigou um tratamento para pitiose experimental em coelhos com minociclina e imunoterapia de forma isoladas e associadas. Anteriormente, acreditava-se que a cirurgia radical, era suficiente para eliminar a doença, mas nem todo o caso se valia disso. Além da cirurgia, agentes antifúngicos e imunoterapia tem sido recomendada, assim como a combinação entre eles e com agentes antibióticos (MAENO et al., 2019; PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2019).

Muitas pesquisas tem sugerido associações de tratamento para a pitiose, como, a combinação com óleos essenciais e imunoterapia (FONSECA et al., 2015). Investigações *in vitro* utilizando nanotecnologia também revelaram resultados satisfatórios na busca de novos protocolos (DE SOUZA SILVEIRA VALENTE et al., 2016). Além disso, Jesus et al. (2015) também sugeriram que combinações de carvacrol ou timol com agentes antimicrobianos podem ser eficazes contra a pitiose cutânea devido às suas interações sinérgicas.

Neste contexto, o artigo 1 da presente tese, avaliou a evolução das lesões dos coelhos com pitiose experimental durante os 70 dias de experimento *in vivo*, comparando os grupos de tratamento entre eles, com o grupo doente (controle). A correlação linear de *Pearson* mostrou que as lesões subcutâneas involuíram com os tratamentos (minociclina, imunoterapia e a associação), quando comparados com o grupo controle, o qual teve três animais mortos ao longo do experimento.

No entanto, o grupo tratado somente com minociclina apresentou menor variação no tamanho da lesão, seguido pelo grupo que recebeu a associação, imunoterapia mais minociclina. Por outro lado, no presente estudo foi observada a redução total da lesão de um animal do grupo tratado com a associação, minociclina mais imunoterapia. Contexto que corrobora com estudos anteriores de Agnihotri e Gaur (2012), e Kloppenburg et al. (1994), os quais também sugerem que a minociclina apresenta atividade imunomoduladora, o que instiga acreditar que ela auxiliou na redução da carga microbiana, justificando o presente estudo.

Durante o tratamento experimental, três animais do grupo controle doente foram a óbito, os mesmos apresentaram metástases, comprovadas através da necrópsia nos rins e pulmões, características que foram comparadas, após a eutanásia, e no final do experimento, com os grupos tratados com minociclina e imunoterapia, os quais não apresentavam. Neste contexto, a capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora da minociclina pode ter influenciado na sobrevivência dos animais com pitiose, ao mesmo tempo que, provavelmente previniu metástases nos órgãos vitais (SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006). Sugere-se que esta característica seja em decorrência de sua estrutura química, que conforme descrito por Maalan, Guardabassi e Papich (2014) distribui-se livremente para o fluido intersticial, e este fenômeno é em decorrência de sua alta lipofilicidade. Além disso, Jesus et al. (2016) contribuem com a hipótese que a minociclina apresente atividade fungistática, e por isso reduz a progressão da lesão subcutânea desenvolvida na pitiose em modelo experimental.

Por outro lado, muitos estudos investigam novas hipóteses para complementar a proposta por Mendoza e Newton (2005), os quais afirmam que a resposta imune do hospedeiro à infecção natural da pitiose é baseada na resposta Th2 com inflamação eosinofílica e liberação de IL-4 e IL-5, associados à progressão e à cronificação da doença. Especula-se que as propriedades curativas da imunoterapia alterem o padrão de resposta Th2 para resposta Th1 (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003) e, podem ser investigados através do sistema purinérgico e em células como linfócitos e plaquetas (BACH et al. 2010; 2013).

De acordo com Marcus et al. (2003) e Bours et al. (2006), as plaquetas interagem com fungos invasores em diferentes estágios da infecção, e também em diferentes locais do organismo. Os nucleotídeos de adenina e a adenosina são liberados a partir dos grânulos das plaquetas, no meio extracelular, diante de uma ativação por um sinal de infecção e, ou processo inflamatório. Os quais atuam modulando a resposta vascular, através de receptores que estão na membrana plaquetária, como os purinérgicos e os receptores membro da família do fator de necrose tumoral (SOUZA et al., 2012).

Corroborando, Bach et al. (2010 e 2013) realizaram mensurações de ectoenzimas em linfócitos de coelhos com pitiose experimental, e relataram o envolvimento de ectonucleotidasas. Neste contexto, a presente tese também apresenta resultados complementares no manuscrito 1, o qual teve o objetivo de

avaliar o sistema purinérgico através da atividade de ectoenzimas na hidrólise de nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeo de adenosina em amostras de plaquetas de coelhos infectados por *P. insidiosum* e tratados com minociclina e imunoterapia.

Observou-se nesse estudo, o aumento do ATP extracelular nos grupos tratados com minociclina e imunoterapia, quando comparados com os controles, grupo doente e não tratado, e grupo saudável. De acordo com Burnstock (2016), há liberação de ATP a partir de células lesadas, resultando em resposta inflamatória através do aumento da síntese de prostaglandina E2, conseqüentemente ocorre a ligação aos receptores de células P2X7 durante a inflamação aguda (BODIN, BURNSTOCK, 1998). Além disso, Zimmermann (2001) afirma que a molécula de ATP pode atuar como co-substrato para outras ectoenzimas, além de NTPDase, como ecto-quinases, resultando na produção de fosfoproteína e ADP.

Contudo, houve um aumento na atividade de E-NTPDase durante a infecção provocada pelo *P. insidiosum*, quando se tratou de substrato ADP. Provavelmente, a doença induz um aumento na hidrólise de ADP, das plaquetas, como um mecanismo compensatório para inibir a agregação plaquetária. O ADP é o promotor mais importante da agregação plaquetária, e a adenosina é um inibidor deste processo. O aumento de ADP no meio extracelular pode também levar a uma reação pró-inflamatória, principalmente pela liberação de mediadores, como fator de necrose tumoral  $\alpha$ , IL-12, IL-1b e espécies reativas de oxigênio, que colaboram na indução de uma resposta imune Th1 (YEGUTKIN, 2008). Assim, os efeitos do ADP e do ATP, no meio extracelular, são proporcionados pela ligação aos purinoreceptores P2X expressos na célula alvo (SOUZA et al., 2012).

Corroborando, Bours et al. (2006) afirmam que baixas concentrações de ATP extracelular e ADP possuem afinidade para purinoreceptores P2Y, que estimulam a resposta imune Th2, como também foi afirmado por Di Virgilio, Boeynaems, Robson (2009). Em contrapartida, Katoh (2009) sugere que há outras vias envolvidas, como a que envolve a liberação de quimiocinas, CCL17 (migração de célula Th2) e CXCL12 (tráfego de monócito), e que com baixas concentrações de ADP conseguem induzir agregação plaquetária, podendo causar grande agregação ao agir em combinação com estas quimiocinas, trazendo sérias conseqüências para o hospedeiro.

Neste contexto, devido as características não microbianas e anti-inflamatórias e citoprotetoras da minociclina, sugere-se que ela influencia diretamente no estado de saúde geral do hospedeiro, sendo importante a recomendação da administração até o décimo terceiro dia de tratamento para a pitiose, devido à janela de ação da imunoterapia e a citoproteção a partir das características não microbianas da minociclina. Corroborando, Santurio et al. (2003) afirmam que a formação de anticorpos pode levar de sete a quatorze dias, sendo assim, após esse período, sugere-se o tratamento apenas com o imunoterápico Pitium-Vac<sup>®</sup>.

Além disso, também existe na superfície plaquetária a ecto-nucleótido pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), que pode catalisar a hidrólise de ATP e ADP, formando AMP. Este fato, poderia justificar o presente achado, e acaba sendo uma oportunidade para maiores investigações. Um estudo semelhante realizado por Nakaar et al. (1998) apontou que o ATP é hidrolisado para AMP pela enzima NTPase1 recombinante do *Toxoplasma gondii* e conseqüentemente, ocorre pouca acumulação de ADP. Além disso, a NTPase3 recombinante, hidrolisa ATP rapidamente para ADP mas degrada-a lentamente até AMP, isto ocorre devido estas enzimas compartilharem 97% dos seus aminoácidos.

Por outro lado, níveis elevados de AMP servem como substrato para a produção da adenosina, através da E-5'-NT, que apresenta propriedades anti-inflamatórias assim como efeitos tromboregulatórios (BOROWIEC et al., 2006). A qual também exerce a potente ação anti-inflamatória e imunossupressora através da ligação aos receptores P1 (FREDHOLM et al., 2001). Nesse sentido, defende-se este protocolo de tratamento devido a segurança evidente até o momento e a cura eminente. A supressão da doença poderia também estar associada à supressão da cascata inflamatória envolvendo as MMP e a via CD40-CD40L.

Entretanto, os resultados deste estudo também não confirmaram alterações na atividade da E-ADA, o que acredita-se que o nucleosídeo, adenosina, esteja presente em condições fisiológicas normais. De acordo com Di Virgilio (2007) a sinalização purinérgica também pode ter um profundo impacto em reações prolongadas e observadas em vários estados inflamatórios crônicos, na proliferação celular, diferenciação e apoptose. Por outro lado, Jacob et al. (2013) afirma que após a progressão da resposta imunitária, o sistema purinérgico mediado por nucleotídeos, também pode tornar-se imunomodulador em resposta a sinais microambientais de acordo com o tecido em que a resposta ocorre.

Da mesma forma que fragmentos de hifas podem romper e circular na corrente sanguínea, dando origem a maior disseminação (SORGO et al., 2013; GIRARD et al., 2013). Corroborando, Giuliani, Hader e Yong (2005) sugerem que há relação da minociclina com os níveis do ligante CD40L, em células T e plaquetas, que conseqüentemente poderia haver imunomodulação, e conseqüente redução da liberação de ATP e ADP, o que acarretaria na quantidade de AMP produzido (HENN et al., 1998; LAM; VIJAYAN; RUMBAUT, 2015).

Em adição, a minociclina contribui para modular a resposta inflamatória, já que também apresenta propriedades anticolagenase, e pode estar influenciando a limitação da lesão aos órgãos (GOLUB et al., 1991), conforme histologia realizada pós experimento, e que tem sido atualmente explorada em mais de 30 ensaios clínicos em andamento ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Giuliani, Hader e Yong (2005) afirmam que a minociclina tem efeito direto na redução do TNF- $\alpha$ , IL-1 e MMP. De acordo com Thomas (2003), esta situação poderia induzir uma contribuição para a resposta Th2 também. Além disso, Romero-Perez et al. (2008) e Peterson (2004) contribuem afirmando que a minociclina atuou diminuindo o tamanho das lesões nos tecidos cardíacos, comprovados através da redução na atividade da MMP-9 e do estresse oxidativo.

Neste contexto, as enzimas localizadas na superfície das plaquetas merecem ser mais estudadas, uma vez que as plaquetas são numerosas e móveis, o que facilita a transferência de informação para os diferentes locais do organismo, interagindo entre si e com outras células sanguíneas, durante sua vida útil. Assim, os fungos invasores também poderiam desencadear ativação plaquetária e interagir com elas ao longo da infecção.

## 7 CONCLUSÃO

- Os resultados descritos neste estudo sugerem um tratamento satisfatório para pitiose e estabelecem um novo protocolo de tratamento, com minociclina (10 mg / kg) até o décimo terceiro dia para modular a inflamação desencadeada pela infecção, e a administração da imunoterapia (Pitium-Vac®) a partir do décimo quarto dia até a regressão completa da lesão.
- Também reforçam a teoria que a minociclina possui atividade fungistática em coelhos infectados com *P. insidiosum*, e a imunoterapia é uma opção eficaz de terapia combinada, pois cura um animal durante o período de tratamento através do desenvolvimento de uma Resposta Th1.
- Estima-se que outras vias de sinalização estejam envolvidas também na ativação das plaquetas e podem estar influenciando na modulação da função imunológica da resposta ao tratamento para pitiose, sendo relevante compreender melhor o processo inflamatório que ocorre na doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, B. N. *et al.* Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75072, 2013.
- ALEXOPOULOS, C.J. *et al.* **Introductory Mycology, Phylum Oomycota**. 4.ed., New York: John Wiley & Sons.Inc. Chap.23, p. 683-737, 1996.
- ÁLVAREZ, J. A.; VARGAS VILORIA, M. I.; PERDOMO AYOLA, S.C. Clinical and Histopathological Evaluation of Cutaneous Pythiosis in Donkeys (*Equus asinus*). **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 25, p. 9-19, 2013.
- AGNIHOTRI, R.; GAUR, S. Chemically modified tetracyclines: Novel therapeutic agents in the management of chronic periodontitis. **Indian Journal Pharmacology**, 44, p.161–167, 2012.
- AUSTWICK, P.K.C., COPLAND, J.W. Swamp cancer. **Nature**, v.250, p.84, 1974.
- BACH, B. C. *et al.* E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. **cell biochemistry and function**, v.31, p.476-81, 2013.
- BACH, B. C. *et al.* Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. **Biomedical Pharmacotherapy**, v.64, p.718-22, 2010.
- BAGGA, B. *et al.* Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 102, p. 1629-1633, 2018.
- BOSCO, S. M. G. *et al.* Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.
- BOTTON, S. A. *et al.* Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**, v. 62, p.1225–1229, 2011.
- BOURS, M. J. L. *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976.
- BROGDEN, R. N.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Minocycline: a review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 9, n. 4, p. 251-291, 1975.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p.31–304, 2004.

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

CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v.157, p. 375-80, 1986.

CHANDLER, F. W. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. **A Color Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases**. Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, p.104–105, 1980.

CUENCA-ESTRELLA, M. *et al.* Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 48, p.1782–1786, 2010.

DE AZEVEDO, M. I. *et al.* E-NTPDase and E-ADA activities in rats experimental infected by *Cryptococcus neoformans*. **Veterinary microbiology**, v. 174, n. 1, p. 206-213, 2014.

DE AZEVEDO M.I. *et al.* Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Veterinary Microbiology**, 159:141-148, 2012.

DE HAAN, J.; HOOBKAMER, L. J. Hypho-mycosis destruens. Veeartsennijkunige Bld. **Nederlands Voor-Indië**, v. 13, p. 350-374, 1901.

DE SOUZA SILVEIRA VALENTE, J. *et al.* In Vitro Activity of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) in Its Free Oil and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v.181, p.865-869, 2016.

DICK, M. W. **Straminipilous fungi : systematics of the peronosporomycetes, including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids, and similar organisms**. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001, xv, 670 p.

DYCUS, D. L.; FISHER, C.; BUTLER, R. Surgical and Medical Treatment of Pyloric and Duodenal Pythiosis in a Dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 51, n. 6, p. 385-391, 2015.

DI VIRGILIO, F.; BOEYNAEMS, J.M.; ROBSON, S. C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 507–513, 2009.

DOMERQ, M.; MATUTE, C. Neuroprotection of by tetracyclines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 12, p. 609-12, 2004.

FERNANDES, C. P. M. *et al.* Gastric pythiosis in a dog. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 4, p. 235-237, 2012.

FOIL, C.S. Update on pythiosis (Oomycosis). **Proceedings**, p. 57-63, 1996.

FONSECA, A. O. S. *et al.* Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Veterinary microbiology**, v. 178, n. 3, p. 265-269, 2015.

FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LUIS, C.; BLANCO, J. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunological Reviews**, 161, p. 27–42, 1998.

FREDHOLM, B. B. *et al.* Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **Biochemical pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 443-448, 2001.

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

GABRIEL, A. L. *et al.* Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 583-587, 2008.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Minocycline: far beyond an antibiotic. **British journal of pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 337-352, 2013.

GIRARD, V. *et al.* Secretomes: the fungal strike force. **Proteomics**, v.13, p. 597–608, 2013.

GIULIANI, F.; HADER, W.; YONG, V. W. Minocycline attenuates T cell and microglia activity to impair cytokine production in T cell-microglia interaction. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 1, p. 135-43, 2005.

GRANT, D. *et al.* Cutaneous pythiosis in a Red Brangus beef calf cured by immunotherapy. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, p. 1-3, 2016.

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

GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. J. Antifungal therapy. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R., *et al.* (Ed.). **Clinical Mycology**. 2<sup>a</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier. cap. 7, p.161-195, 2009.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal Aromath**, v.12, p. 83-91, 2002.

HE, H. *et al.* Diagnosis and treatment of *Pythium insidiosum* corneal ulcer in a Chinese child: a case report and literature review. **American Journal of Case Reports**, v. 17, pp. 982-988, 2016.

HENN, V. *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. **Nature**, n. 391, p. 591–594, 1998.

HILTON, R.E., *et al.* Swamp cancer: A case of human pythiosis and review of the literature. **British Journal of Dermatology**, v. 175, n. 2, p. 394-397, 2016.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Retrieved from <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm>. 2014.

INTARAMAT, A. *et al.* Protein A/G-based immunochromatographic test for serodiagnosis of pythiosis in human and animal subjects from Asia and Americas. **Medical Mycology**, v. 54, p.641-7, 2016.

ITAQUI, S. R. *et al.* In Vitro Synergism between Azithromycin or Terbinafine and Topical Antimicrobial Agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 5023-5025, 2016.

JACOB, F. *et al.* Purinergic signaling in inflammatory cells: P<sub>2</sub> receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. **Purinergic Signalling**, v. 9, n.3, p. 285–306. 2013.

JESUS, F. P. K. *et al.* In Vitro and In Vivo Antimicrobial Activities of Minocycline in Combination with Azithromycin, Clarithromycin, or Tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 5023-5025, 2016.

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

JIANG, R. H. Y.; TYLER, B. M. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, n. 1, p. 295-318, 2012.

JINDAYOK, T. *et al.* Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 7, p. 1047-1051, 2009.

JOHNSON, M. D. *et al.* Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

JORDAN, J. *et al.* Minocycline and cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy. **Current Drug Delivery**, v. 4, n. 3, p. 225-31, 2007.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. **Nature Reviews Immunology**, [S.l.], v.11, n.3, p.201-12, 2011.

KATOH, N. Platelets as versatile regulators of cutaneous inflammation. **Journal of Dermatological Science**, v. 53, p. 89–95, 2009.

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

KRAJAEJUN, T. *et al.* Effect of temperature on growth of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 41, n. 6, p. 1462-6, 2010.

KLOPPENBURG, M. *et al.* Minocycline in active rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 37, n. 5, p. 629-636, 1994.

LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 1104 p., 2002.

LAM, F.W.; VIJAYAN, K.V.; RUMBAUT, R.E. Platelets and their interactions with other immune cells. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1265–1280, 2015.

LEDUR, P.C. *et al.* Dendritic cells pulsed with *Pythium insidiosum* (1,3)(1,6)-betaglucan, heat-inactivated zoospores and immunotherapy prime naive T cells to Th1 differentiation *in vitro*. **Immunobiology**, v. 223, n. 3, p. 294–299, 2018.

LELIEVRE, L. 2015. Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v 92, n. 2, p. 270-273, 2015.

LEMAITRE, M. *et al.* Protective activity of tetracycline analogs against the cytopathic effect of the human immunodeficiency viruses in CEM cells. **Research in Virology**, 1990.

LERKSUTHIRAT, T. *et al.* Evolution of the Sterol Biosynthetic Pathway of *Pythium insidiosum* and Related Oomycetes Contributes to Antifungal Drug Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02352-16, 2017.

LORENZI, T. F. *et al.* **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 655 p.

LORETO, E. S. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 3588–3590, 2011.

LORETO, E. S. *et al.* New insights into the *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7534–7537.

LORETO, E. S. *et al.* *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and

*Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 01678–01617, 2018.

LORETO, E. S.; TONDOLO, J. S. M.; SANTURIO, J. M. *Pythium insidiosum* - An Emerging Mammalian Pathogen. In: RAI, M.; ABD-ELSALAM, K. A.; AVINASH, P. I. **Pythium: Diagnosis, Diseases and Management**. 1 ed., 2020. cap. 13, p. 1-42.

LUNKES, I. G. *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, p. 189-194, 2003.

MACHADO, G.; WEIBLEN, C.; ESCOBAR, L. E. Potential distribution of *Pythium insidiosum* in Rio Grande do Sul, Brazil, and projections to neighbour countries. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 1671-1679, 2018.

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

MAALAND, M. G.; GUARDABASSI, L.; PAPICH, M. G. Minocycline pharmacokinetics and pharmacodynamics in dogs: dosage recommendations for treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infections. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 3, p. 182, 2014.

MAENO, S. *et al.* Successful medical management of *Pythium insidiosum* keratitis using a combination of minocycline, linezolid, and chloramphenicol. **American Journal of Ophthalmology**, v. 15, p. 100498, 2019.

MARTINS, T. B. *et al.* A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, n. 2-3, p. 122-131, 2012.

MARCUS, A. J. *et al.* Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, p.2497-2509, 2003.

MASON, D. J.; MORTIMER, F. C.; GANT, V. A. Antibiotic Susceptibility Testing by Flow Cytometry. **Current Protocols in Cytometry**, p. 11.8.1 -11.8.9, 2001.

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

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

MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum* vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, v.21, p.2797-804, 2003.

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

MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**, v. 47, n. 1-2, p. 14-23, 2004.

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**, v.7, p.198–208, 2013.

MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 377-382, 1981.

MILLER, R. I; CAMPBELL, R. S. F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 227-231, 1982.

MILLER, R. I. **Granulomatous and neoplastic disease of equine skin: a review**. Veterinary Reviews and Monographs, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia, p. 1–92, 1983.

MONTEIRO, A. B. **Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum***. 1999. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

NAGARAKANTI, S.; BISHBURG, E. Minocycline an Antiviral Agent? A Review of Current Literature. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 118, p. 4-8, 2016.

NAKAAR, V. *et al.* Basis for substratespecificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphatehydrolase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 97, p.209–220,1998.

NURDEN, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 105 Suppl 1, p. S13-S33, 2011.

OIE. World Organization for Animal Health. 2017. Retrieved from [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalpopulation](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalpopulation)

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

PEREIRA, D. I. *et al.* Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**, v.38, p.143-147, 2008.

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

- PERMPALUNG, N. *et al.* Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 1885-1892, 2015.
- PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; CHINDAMPORN, A. Human Pythiosis: Emergence of Fungal-Like Organism. **Mycopathologia**. 2019.
- PESSOA, A. F. A. *et al.* Doencas de pele em equideos no semiarido brasileiro. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 743-748, 2014.
- PINA-VAZ, C. *et al.* A. Comparison of Two Probes for Testing Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Voriconazole, Itraconazole, and Caspofungin by Flow Cytometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4674-4679, 2005.
- PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 638, p. 281-9, 2010.
- PILLA, C. *et al.* ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**. v. 7, p. 225-230, 1996.
- POPOVIC, N. *et al.* Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. **Annals of Neurology**, v. 51, n. 2, p. 215-23, 2002.
- RAHMAN, M. *et al.* Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. **Inflammation Research**, v. 61, p. 571-579, 2012.
- RAMAPPA, M. *et al.* Successful Medical Management of Presumptive *Pythium insidiosum* Keratitis. **Cornea**, v. 36, n. 4, p. 511-514, 2017.
- RAWN, D.; VANE TTEN, J. L. Antibiotic inhibition of protein synthesis in *Pythium ultimum*. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, v. 4, p. 128-129, 1977.
- RAWN, C. D.; VAN ETTEN, J. L. A shake culture method for Pythiaceae applicable to rapid, small-scale assay of vegetative physiology. **Phytopathology**, v. 68, p. 1384-1388, 1978.
- REINPRAYOON, U. *et al.* Lagenidium sp. ocular infection mimicking ocular pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2778-2780, 2013.
- RIVIERRE, C. *et al.* Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.
- ROMERO-PEREZ, D. *et al.* Cardiac uptake of minocycline and mechanisms for *In Vivo* Cardioprotection., v. 52, n. 13, p. 1086-1094, 2008.
- SANTOS, C.E.P. *et al.* Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 8, p. 1397-1399, 2011.

SANTOS, I. M.; FRANZON, C. M. R.; KOGA, A. H. Diagnóstico laboratorial de leucemia mielomonocítica crônica agudizada em associação com leucemia linfocítica crônica: aspectos morfológicos e imunofenotípicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.34, p.242-4, 2012.

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

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

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

SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. **Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008. 111 p.

SAPADIN, N. A.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 258-65, 2006.

SCHURKO, A. *et al.* Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and 543 the Americas are explored. **Mycologia**, v. 95, p.200–2008, 2003.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO, J. E, JR FREEDMAN J. Platelets and the immune continuum. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p. 264–274, 2011.

SERMSATHANASAWADI, N. *et al.* Outcomes and factors influencing prognosis in patients with vascular pythiosis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 64, n. 2, p. 411-417, 2016.

SHAPIRO, H. M. Membrane potential estimation by flow cytometry. **Methods**, v. 21, p. 271-279, 2000.

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

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica á Luz de Autores contemporâneos**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 388, 2010.

SMITH, F. The pathology of bursattee. **The Veterinary Journal**, v. 19, n. 7, p. 16–171884.

- SORGO, A.G. *et al.* Beyond the wall: *Candida albicans* secret(e)s to survive. **FEMS Microbiol Lett**, v. 338, p. 10-17, 2013.
- SOUZA, V.C.G. *et al.* Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. **Purinergic signalling**, v. 8, n. 4, p. 753-762, 2012.
- TONDOLO, J.S.M. *et al.* Extraction, characterization and biological activity of a (1,3)(1,6)-beta-d-glucan from the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, n. 719-727, 2017.
- THITITHANYANONT, A. *et al.* Use of an immunogenic therapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1394–1400, 1998.
- TSAO, P. H. Selective media for isolation of pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, 1970.
- VALE-SILVA, L.A. *et al.* Comparison of the Etest and a rapid flow cytometry-based method with the reference CLSI broth microdilution protocol M27-A3 for the echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p.941-6, 2012.
- VILELA, R.; MENDOZA, L. Lacazia, lagenidium, pythium, and rhinosporidium. pp. 2196–2208. In: Jorgensen, James H., Pfaller, Michael A. and Carroll, Karen C. (eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. **American Society for Microbiology**, ASM Press, Washington, DC. 2015.
- WEIBLEN, C. *et al.* Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 126-131, 2016.
- WHITE, P. L.; ARCHER, A. E.; BARNES, R. A. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2181-2187, 2005.
- YEGUTKIN, G.G. Nucleotide and nucleoside-converting ectoenzymes:important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1783, v.673–694, 2008.
- ZANETTE, R. A. *et al.* Toll-deficient Drosophila is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiology and immunology**, v. 57, n. 10, p. 732-735, 2013.
- ZIMMERMANN, C.E.P. *et al.* *In vivo* effect of minocycline alone and in combination with immunotherapy against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 243, n. 108616, p. 1-5, 2020.
- WORASILCHAI, N. *et al.* Monitoring Anti-Pythium insidiosum IgG Antibodies and (1→3)-β-D-Glucan in Vascular Pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 00610-18, 2018.

## Anexo 1 – Comprovante de Submissão do Manuscrito 2

Cell Biochemistry &amp; Function



**E-NTPDASE, E-5'-NT and E-ADA activities in platelets of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy and minocycline.**

Journal:	<i>Cell Biochemistry &amp; Function</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Zimmermann, Carine; UFSM, Microbiology and parasitology JESUS, FRANCIELLI; UFSM, Microbiology and parasitology Schlemmer, Karine; Universidade Federal de Santa Maria, Microbiologia e Parasitologia Gelaín, Livia; UFSM, Microbiology and parasitology Tondolo, Juliana; Universidade Federal de Santa Maria, Loreto, Erico; Universidade Federal de Santa Maria, Microbiologia e Parasitologia Leal, Daniela; UFSM, Microbiologia e Parasitologia Alves, Sydney; Universidade Federal de Santa Maria, Ferreiro, laerte; UFSM, Microbiologia e Parasitologia Santurio, Janio; Universidade Federal de Santa Maria, Microbiologia e Parasitologia
Keywords:	platelets, E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, E-adenosine deaminase, <i>Pythium insidiosum</i>
Abstract:	This study aimed to evaluate the activity of the enzymes E-NTPDase and E-5'-nucleotidase and E-adenosine deaminase (E-ADA) in platelets from rabbits inoculated with <i>P. insidiosum</i> and treated with immunotherapy and minocycline. Twenty five rabbits, aged three months old and subcutaneously inoculated with <i>Pythium insidiosum</i> zoospores were divided into five groups (n=5): treated with minocycline (10 mg/kg/day twice daily), treated with immunotherapy (34 mg subcutaneously every 14 days), treated with minocycline plus immunotherapy, and untreated and healthy group. The treatments were started 30 days after inoculation, by 70 weeks, and only in the rabbits that developed lesions. The infected and untreated group differed significantly increased in relation to the healthy group only in the hydrolysis of ADP and AMP. The results too showed that E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities were decreased in the immunotherapy-treated groups, which consequently increased the extracellular concentration of extracellular ATP, ADP and AMP. E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities were decreased in the immunotherapy-treated groups and they were increased in the isolated minocycline-treated group. The enzymes activities were decreased in the treatment association minocycline plus immunotherapy-treated. E-ADA activity did not change in the context of infection with the oomycete. Our results reiterate the hypothesis of purinergic system receptor

## Anexo 2 - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

### **CARTA DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** "Avaliação in vitro e in vivo da susceptibilidade do oomiceto *Pythium insidiosum* frente antibióticos e antifúngicos associados"

**Numero do Parecer:** 055/2012

**Pesquisador Responsável:** Janio Morais Santurio

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:**

Santa Maria, 10 de Setembro de 2012.

A handwritten signature in black ink, reading "Roselei Fachinetto".

Roselei Fachinetto

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM