

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

**O PAPEL DO ÍON FERRO NAS INFECÇÕES
POR *Pythium insidiosum***

TESE DE DOUTORADO

Régis Adriel Zanette

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**O PAPEL DO ÍON FERRO NAS INFECÇÕES
POR *Pythium insidiosum***

Régis Adriel Zanette

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Zanette, Régis Adriel
O papel do íon ferro nas infecções por *Pythium insidiosum* / Régis Adriel Zanette.-2014.
164 p.; 30cm

Orientador: Janio Morais Santurio
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. *Pythium insidiosum* 2. Metabolismo do ferro 3. Deferasirox 4. Pitiose I. Morais Santurio, Janio II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Régis Adriel Zanette. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail regnitro@yahoo.com.br

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**O PAPEL DO ÍON FERRO NAS INFECÇÕES
POR *Pythium insidiosum***

elaborada por
Régis Adriel Zanette

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Janio Moraes Santurio, Dr.
(Presidente/Orientador)

Daniela Isabel Brayer Pereira, Dr^a. (UFPEL)

Laerte Ferreira, Dr. (UFRGS)

Rafael Almeida Figuera, Dr. (UFSM)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 30 de janeiro de 2014.

Que os resultados obtidos a partir dos esforços despendidos nesse estudo, principalmente em relação aos animais utilizados, tenham fundamentação para salvar outros animais e até mesmo humanos acometidos por essa lastimável enfermidade. Contudo, parafraseando *George Bernard Shaw*, o problema aqui investigado deve ter criado pelo menos outros dez.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Janio Santurio, que foi mais que um orientador, foi um verdadeiro mestre, me mostrando o caminho sem deixar de me instigar a pensar. Se aprendi algo, e com certeza adquiri uma infinidade de conhecimento, foi por ter me espelhado no senhor. Agradeço por ter tido sempre a porta aberta, daqueles amigos que entram na sala sem precisar bater, e espero ter sido um aluno à altura da confiança depositada.

Ao Prof. Sydney Alves, por ter me recebido inúmeras vezes nos finais de tarde em sua sala, em encontros nos quais eu colocava minhas aflições e o senhor alimentava minha mente com ideias e hipóteses. Obrigado por ter confiado a mim parte dessas ideias.

Aos meus pais, que me apoiaram de forma plena na continuidade da formação acadêmica. Espero que saibam o quanto sou grato.

A minha esposa Paula, por ter segurado minha mão quando, por diversas vezes, o tempo ficou feio. Por ter sido uma motivadora incansável, por ter andado junto e dividido as alegrias e as consternações. É maravilhoso contar contigo. Aproveito a deixa para agradecer aos meus sogros pelas carnes de ovelha e bolos verde que alimentaram esse vivente.

Aos colegas que atuaram diretamente, por vezes bravamente, na realização deste estudo: Carla, Francielli, Lucas, Maiara, Patrique e Pedro. Estou ciente de que muitas vezes fui um chato, mas espero que, assim como eu, guardem boas lembranças desse período.

Aos demais amigos e colegas do LAPEMI, que com certeza contribuíram no mínimo indiretamente me aturando todos esses anos. Agradeço ao Dr. Érico Loreto que dividiu comigo seus conhecimentos em micologia, em informática e em jogos online.

Aos patologistas Prof. Rafael Figuera e Mariana Flores, que aceitaram o desafio e contribuíram significativamente para este estudo.

A special thanks to Prof. Dimitrios Kontoyiannis, who received me very well at The University of Texas MD Anderson Cancer Center. It was really great to join your lab and to make friends as Nathan, Dr. Shirazi and Dr. Farmakiotis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial ao coordenador Prof. Carlos Mello e à secretária Zeli, pelo auxílio administrativo e financeiro sempre com muito boa disposição. Parabéns pelo excelente trabalho.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro para realização deste estudo e pelas bolsas de pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela disponibilização da estrutura física e administrativa.

O ouro é para a amante.
Prata, para a empregada doméstica.
Cobre, para o artesão, astuto em seu comércio.
"Bom!" disse o barão, sentado em sua sala,
"Mas o ferro – ferro frio – é o mestre de todos eles."

Rudyard Kipling

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

O PAPEL DO ÍON FERRO NAS INFECÇÕES POR *Pythium insidiosum*

AUTOR: RÉGIS ADRIEL ZANETTE

ORIENTADOR: PROF. DR. JANIO MORAIS SANTURIO

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 30 de janeiro de 2014

O oomiceto *Pythium insidiosum*, classificado no Reino Straminipila, é o agente etiológico da pitiose, uma doença crônica, de difícil tratamento e que pode levar à morte. Os fatores predisponentes da doença em mamíferos não são conhecidos, mas suspeita-se que a sobrecarga de ferro exerça um papel direto ou indireto no desenvolvimento da infecção. Este estudo teve por objetivos: avaliar o metabolismo do ferro em coelhos com pitiose experimental; verificar a atividade antifúngica e o mecanismo de ação *in vitro* do quelante de ferro deferasirox frente a isolados de *P. insidiosum* e comparar o tratamento e o mecanismo de ação do fármaco com a imunoterapia *in vivo*; verificar a atividade antifúngica da micafungina, sozinha e em combinação com deferasirox, *in vitro* e *in vivo*; desenvolver um modelo experimental de pitiose utilizando-se a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* com sobrecarga de ferro. Os testes de susceptibilidade aos fármacos foram realizados com 17 isolados clínicos de *P. insidiosum*, utilizando-se o protocolo de microdiluição M38-A2 do CLSI. O mecanismo de ação *in vitro* do deferasirox foi avaliado através da técnica de XTT e DiBAC. Para os testes *in vivo*, foram utilizados cinco coelhos infectados por *P. insidiosum* por grupo, conforme o delineamento a seguir: infectados tratados com placebo, tratados com imunoterápico, tratados com deferasirox, tratados com imunoterápico e deferasirox, tratados com micafungina e tratados com micafungina e deferasirox. Cinco coelhos não infectados foram utilizados como controle negativo. Realizaram-se avaliações hematológicas e bioquímicas, incluindo os níveis séricos de ferro, transferrina e ferritina nos dias 0, 25, 50 e 75 pós-infecção. A quantificação do ferro depositado nos hepatócitos foi realizada após 50 dias de tratamento (dia 75). O mecanismo de ação do deferasirox *in vivo* foi avaliado

através da mensuração da atividade da enzima catabólica adenosina deaminase e da histologia das lesões subcutâneas. Os resultados mostram que *P. insidiosum* demonstrou ser pouco susceptível ao deferasirox *in vitro*, com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) que variaram de 12,5 a 50 µg/ml e concentrações fungicidas mínimas entre 50 e 100 µg/ml. A micafungina não apresentou atividade antifúngica contra *P. insidiosum in vitro* (CIMs > 128 µg/ml) e nos coelhos com pitiose. Contudo, sinergismo foi observado em 88% dos isolados quando a micafungina foi associada ao deferasirox, e as lesões dos coelhos estavam diminuídas em relação aos demais grupos (P = 0,06). No geral, os coelhos infectados apresentaram anemia microcítica hipocrômica com depleção das reservas corporais de ferro, que foi menos acentuada nos grupos tratados com imunoterápico ou quelante de ferro. Apesar do deferasirox não ter sido capaz de conter a infecção, o mesmo teve ação tóxica sobre as hifas de *P. insidiosum in vitro* e teve ação imunomodulatória sobre as lesões, em um padrão similar ao observado nos coelhos tratados com imunoterapia. Contudo, o uso do deferasirox favoreceu a disseminação pulmonar da doença por mecanismos não compreendidos. Moscas *D. melanogaster* foram resistentes à infecção por *P. insidiosum*, independente da sobrecarga de ferro. Entretanto, *D. melanogaster* deficientes de receptores do tipo Toll foram susceptíveis à infecção, evidenciando a importância desses receptores na pitiose. Em conclusão, coelhos com pitiose apresentaram anemia por deficiência de ferro e, apesar do efeito quelante do deferasirox, a utilização do mesmo deve ser avaliada com cuidado devido à disseminação da doença em alguns animais.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*. Metabolismo do ferro. Deferasirox.

ABSTRACT

Thesis of Doctorate
Post-Graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

THE ROLE OF THE IRON ION IN *Pythium insidiosum* INFECTIONS

AUTHOR: RÉGIS ADRIEL ZANETTE

ADVISOR: PROF. DR. JANIO MORAIS SANTURIO

Place and Date: Santa Maria, January 30th, 2014

The oomycete *Pythium insidiosum*, classified in the kingdom Straminipila, is the agent of pythiosis, a chronic disease that can be hard to treat and life-threatening. The predisposing factors in mammals are unknown, but the iron overload is suspected to act directly or indirectly in the development of the infection. This aim of this study was: to evaluate the iron metabolism in rabbits with experimental pythiosis; to verify the antifungal activity and the mechanism of action *in vitro* of the iron chelator deferasirox against *P. insidiosum* isolates and to compared the treatment and the mechanism of action of the drug with immunotherapy *in vivo*; to verify the antifungal activity of micafungin, alone and in combination with deferasirox, *in vitro* and *in vivo*; to develop an experimental model of pythiosis using the fruit-fly *Drosophila melanogaster* with iron overload. The drug susceptibility tests included 17 *P. insidiosum* clinical isolates, and were performed according to the CLSI M38-A2 guidelines. The mechanism of action of deferasirox was evaluated by the XTT and DiBAC assays. For the *in vivo* tests, five *P. insidiosum* infected rabbits were included per group, as follows: infected treated with placebo, treated with immunotherapy, treated with deferasirox, treated with immunotherapy and deferasirox, treated with micafungin and treated with micafungin and deferasirox. Five uninfected rabbits were used as controls. Hematological and biochemical analyses were performed at days 0, 25, 50 and 75 post-infection. The quantification of iron in the hepatocytes was performed after 50 days of treatment (day 75). The mechanism of action of deferasirox was evaluated by the quantification of the catabolic enzyme adenosine deaminase and by the histology of the subcutaneous lesions. The results show that *P. insidiosum* is poorly susceptible to deferasirox *in vitro*, with minimum inhibition concentrations (MICs) ranging from 12.5 to 50 µg/ml and minimum fungicidal

concentrations between 50 and 100 µg/ml. No activity against *P. insidiosum* was observed for micafungin *in vitro* (MICs > 128 µg/ml) and in rabbits with pythiosis. Notwithstanding, synergism was observed in 88% of the isolates when micafungin was combined with deferasirox, and the lesions were decreased in comparison to the other groups (P = 0.06). In general, the rabbits showed microcytic hypochromic anemia with depleted iron stores, which was less prominent in the groups treated with immunotherapy or deferasirox. Despite the iron chelator has failed to thwart the infection, deferasirox showed toxicity against *P. insidiosum* hyphae *in vitro* and an immunomodulatory action was observed in the lesions, in a similar pattern to that seen in immunotherapy-treated rabbits. However, the use of deferasirox favored the dissemination of the disease to the lung by unrevealed mechanisms. *D. melanogaster* flies were resistant to *P. insidiosum* infection, independently of the iron overload. Conversely, toll-deficient *D. melanogaster* flies were susceptible to the infection, highlighting the importance of these receptors in pythiosis. In conclusion, rabbits with pythiosis showed iron deficiency anemia and, despite the chelating effect of deferasirox, the administration of the drug should be evaluated with care because of the dissemination of the disease observed in some of the treated animals.

Keywords: *Pythium insidiosum*. Iron metabolism. Deferasirox.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da caspofungina, anidulafungina e micafungina	46
Figura 2 – Efeitos das concentrações extracelulares de ATP e adenosina na resposta imune durante a infecção natural e imunoterapia	50
Figura 3 – Evolução das variáveis eritrocitárias no decorrer da evolução da deprivação de ferro	55
Figura 4 – Estrutura química do mesilato de desferroxamina, da deferiprona e do deferasirox.....	65
Figura 5 – Ligação do deferasirox com uma molécula de ferro.....	66
Figura 6 – Visão geral das respostas antimicrobianas de <i>Drosophila spp.</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Adenosina deaminase
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CEM	Concentração efetiva mínima
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CTLF	Capacidade total de ligação do ferro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DiBAC	Ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico) trimetin-oxonol
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima
Fe ²⁺	Ferro ferroso
Fe ³⁺	Ferro férrico
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IFN- γ	Interferon-gama
IGS	Região do espaçador intergênico
ITS	Espaço transcrito interno
HCM	Hemoglobina corpuscular média
NTPDase	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
RDW	Variação da amplitude de distribuição de eritrócitos
RFLP	Polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _r	Ácido ribonucleico ribossômico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCM	Volume corpuscular médio
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética	157
ANEXO B – Licença Elsevier para reprodução do Artigo 1	158
ANEXO C – Licença Oxford University Press para reprodução do Artigo 2.....	159
ANEXO D – Licença John Wiley and Sons para reprodução do Artigo 3.....	160
ANEXO E – Comprovante de submissão do Artigo 4.....	161
ANEXO F – Comprovante de submissão do Artigo 5.....	162

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Agente etiológico	23
1.1.1 Histórico e taxonomia	23
1.1.2 Características e filogenia molecular	24
1.1.3 Ciclo de vida	25
1.1.4 Fatores de virulência.....	26
1.2 Pitiose	27
1.2.1 Epidemiologia	27
1.2.2 Patogenia.....	30
1.2.3 Imunologia	31
1.2.4 Pitiose em espécies domésticas.....	32
1.2.5 Pitiose em espécies não domésticas	36
1.2.6 Pitiose em humanos	37
1.2.7 Modelos experimentais.....	39
1.2.8 Diagnóstico	40
1.2.9 Tratamento cirúrgico e quimioterápico.....	43
1.2.10 Tratamento com equinocandinas.....	45
1.2.11 Tratamento através de imunoterapia	48
1.3 O íon ferro	50
1.3.1 Absorção do ferro	51
1.3.2 Metabolismo do ferro	52
1.3.3 Avaliação laboratorial do metabolismo do ferro	54
1.3.4 Sequestro de ferro e anemia da inflamação	56
1.3.5 Obtenção de ferro pelos fungos.....	58
1.3.6 Desordens metabólicas do ferro	62
1.3.7 Terapia antimicrobiana com quelantes de ferro.....	64
1.4 Modelos invertebrados de infecções fúngicas	68
2 OBJETIVOS	73
2.1 Objetivo geral	73
2.2 Objetivos específicos	73

3 ARTIGOS	75
3.1 Artigo 1	75
3.2 Artigo 2	81
3.3 Artigo 3	83
3.4 Artigo 4	89
3.5 Artigo 5	101
4 DISCUSSÃO	119
5 CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS	129
ANEXOS	155

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agente etiológico

1.1.1 Histórico e taxonomia

Os dois primeiros registros científicos do oomiceto *Pythium insidiosum* foram feitos por cientistas alemães no início do século XX (DE HAAN; HOOGKAMER 1901; WITKAMP, 1924), o qual foi isolado a partir de lesões de equinos na Indonésia. Contudo, a natureza de aspecto fúngico desse micro-organismo já tinha sido descrita por cientistas ingleses ao final do século XIX acometendo equinos na Índia (SMITH, 1884). Pela ausência de esporulação, o agente não pôde ser classificado até 1961, quando então Bridges e Emmons (1961) nomearam o organismo de *Hyphomyces destruens*, com base no nome da doença sugerido anteriormente por De Haan e Hoogkamer (1901). Dessa forma, a partir de 1961 a enfermidade passou a se chamar ficomicose, devido à semelhança com as micoses causadas por zigomicetos.

Somente em 1974 observou-se que o micro-organismo produzia zoósporos quando em meio líquido, sendo nomeado *P. insidiosum*, o qual foi classificado como um oomiceto da família Pythiaceae, dentro da ordem Peronosporales (AUSTWICK; COPLAND, 1974), originando o termo pitiose, como é atualmente descrita a doença. Inicialmente, houve relatos de diferentes espécies de *Pythium* causando doença em equinos. Em 1980, Ichitani e Amemiya (1980) reportaram o agente causal morfológicamente similar a *P. gracile* Schenk, e Shipton (1987) propôs o nome *P. destruens* para um isolado obtido de um equino. Quase que simultaneamente, De Cock et al. (1987), ao analisarem isolados de equinos, bovinos, cães e humanos provenientes de diferentes locais, concluíram que se tratava do mesmo organismo, que foi denominado *P. insidiosum*. Baseado nessa premissa e com o auxílio de provas sorológicas, concluiu-se que essa nova espécie era igual às anteriormente descritas, *Pythium* sp., *P. gracile*, *H. destruens* e *P. destruens* (MENDOZA; MARIN, 1989).

Embora o nome do agente tenha sido estabelecido, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida. Sem dúvida, a disposição filogenética desses organismos na árvore da vida é mais complexa do que se imagina (MENDOZA; VILELA, 2013). Alexopoulos, Mims e Blackwell (1996) propuseram, através de análises filogenéticas e moleculares, que o agente etiológico da pitiose pertence ao Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae. Em uma classificação mais recente (DICK, 2001), *P. insidiosum* foi classificado como membro do reino Straminipila, classe Peronosporomycetes (=Oomycetes), ordem Pythiales e família Pythiaceae. Esta classificação, no entanto, não foi baseada em sequências de DNA e poderá mudar em um futuro próximo (GAASTRA et al., 2010).

1.1.2 Características e filogenia molecular

Os oomicetos compreendem um grupo de organismos que se assemelham morfológicamente aos membros do Reino Fungi, embora tenham sido classificados recentemente no Reino Straminipila e estejam geneticamente mais relacionados a organismos aquáticos, tais como algas marrons e diatomáceas (ADHIKARI et al., 2013). São essencialmente aquáticos, abrangendo desde organismos de vida livre na água até patógenos de plantas, mamíferos, insetos, peixes, crustáceos, algas e vários outros micróbios, incluindo fungos (ADHIKARI et al., 2013; MENDOZA; VILELA, 2013).

Dentro dos oomicetos, o gênero *Pythium* compreende mais de 250 espécies descritas com 50% dessas aceitas pela comunidade científica e classificadas dentro de 11 grupos filogenéticos (LEVESQUE; DE COCK, 2004). As espécies de *Pythium* são geneticamente diferentes e exibem variações em termos de virulência, hospedeiros e distribuição (JIANG; TYLER, 2012; ADHIKARI et al., 2013). A maior parte dessas são sapróbias ou patógenos facultativos de plantas. Outras parasitam fungos, algumas até mesmo têm sido utilizadas para controle biológico de outros oomicetos. Por fim, algumas espécies de *Pythium* são patógenos de insetos, peixes e algas. Até recentemente, *P. insidiosum* era a única espécie capaz de infectar mamíferos (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). No ano de 2011, no entanto, *P. aphanidermatum*, um

patógeno típico de plantas, foi isolado da perna de um soldado após ferimentos causados por artefato explosivo (CALVANO et al., 2011), demonstrando inclusive invasão agressiva dos tecidos semelhante com as lesões descritas nas infecções por *P. insidiosum*. Além disso, uma cepa isolada de um cão na África apresentou um padrão filogenético diferente do publicado por outros autores (RIVIERRE et al., 2005). Esses achados podem indicar que mais de uma espécie pode estar envolvida nos casos de pitiose nos mamíferos. SCHURKO et al. (2003), ao compararem 28 espécies de *P. insidiosum* originárias das Américas, Ásia e Austrália, através de comparação do espaço ribossomal intergênico pela técnica molecular de RFLP (polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição) e análise dos agrupamentos (“clusters”), demonstraram haver grandes diferenças entre os isolados de *P. insidiosum* das três regiões estudadas com a possibilidade real de não serem todas a mesma espécie. Estes autores levantam a possibilidade da necessidade de ocorrer, no mínimo, uma reclassificação como subespécies, pois cada agrupamento de isolados representa populações geneticamente distintas. Essa teoria também foi confirmada no estudo de Azevedo et al. (2012), que demonstraram que isolados brasileiros obtidos de diferentes regiões do país são geneticamente similares entre si e dividem um único ancestral em comum, possivelmente vindo de regiões da Ásia. Corrobora com esses dados a observação de diferenças fenotípicas na produção de exoenzimas, a qual parece diferir entre isolados de diferentes agrupamentos (ZANETTE et al. 2013)

1.1.3 Ciclo de vida

O gênero *Pythium* se caracteriza por desenvolver zoosporângia e zoósporos biflagelados de forma assexuada para colonizar novos ambientes (MENDOZA; VILELA, 2013). Além disso, fazem reprodução sexuada oogâmica, possuem parede celular composta de β (1,3) e β (1,6) glucanas, celulose e hidroxiprolina (MOORE-LANDECKER, 1996). Os oomicetos também diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, nos primeiros ele não é o principal esteroide (ALEXOPOULOS et al., 1996; MOORE-LANDECKER, 1996). De acordo com Hendrix (1964), espécies do gênero *Pythium* incorporam esteroides a partir do

meio ao invés de produzi-los. Os esteroides são importantes para produção de estruturas sexuadas *in vitro*, mas não são necessários para o crescimento da hifa vegetativa (GROOTERS, 2003).

As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema. Primeiramente ocorre a colonização de plantas aquáticas, as quais servem de substrato para seu desenvolvimento e reprodução, formando os zoosporângios (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; GAASTRA et al., 2010). Para a produção de zoósporos móveis, são necessárias temperaturas ambientais entre 30 e 40 °C e o acúmulo de água em banhados e lagoas (MILLER; CAMPBELL, 1982). Dados experimentais mostram que *P. insidiosum* possui um forte tropismo por plantas e por soluções de continuidade na pele de mamíferos (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993), tropismo o qual o agente utiliza para completar seu ciclo de vida na natureza (MENDOZA; VILELA, 2013; SANTOS et al., 2013). Supabandhu et al. (2008) foram os primeiros a isolarem e identificarem *P. insidiosum* em cultura a partir de amostras de água ambientais de áreas endêmicas, e apesar do habitat preferencialmente aquático, a presença de *P. insidiosum* no solo foi recentemente comprovada por técnicas moleculares (VANITTANAKON et al., 2013).

P. insidiosum requer poucos nutrientes para crescer em meios de cultura, sendo capaz de se desenvolver em uma faixa de temperatura que varia de 25 a 40-45 °C (GAASTRA et al., 2010). As colônias apresentam-se transparentes ou esbranquiçadas, submersas, com curto micélio aéreo e padrão delicadamente radiado. As hifas são parcialmente septadas, possuem entre 4 e 10 µm de diâmetro e apresentam ramificações perpendiculares laterais em ângulo reto (DE COCK et al., 1987).

1.1.4 Fatores de virulência

Os oomicetos têm uma origem mosaica, com genes adquiridos por transferência horizontal de endossimbiontes secundários, de fungos e de bactérias (JIANG; TYLER, 2012). O principal tema que emerge de estudos genômicos é que a virulência em oomicetos depende extensivamente, possivelmente com

exclusividade, de grandes e diversificadas famílias de proteínas, que incluem toxinas extracelulares, enzimas hidrolíticas e inibidores das mesmas e proteínas efetoras que entram no citoplasma das plantas (JIANG; TYLER, 2012). A secreção de proteases e enzimas hidrolíticas a partir do ápice das hifas de *P. insidiosum* tem sido implicada como possíveis fatores de virulência (SHIPTON, 1987; RAVISHANKAR et al., 2001; ZANETTE et al., 2013)

Dados sobre a biologia e patogênese de *P. insidiosum* em nível molecular são escassos. Somente quatro genes foram depositados no GenBank. Estes incluem o agrupamento de genes RNAr, bem como genes para exo-1,3-beta glucanase, quitina sintase 2 e citocromo c oxidase subunidade II (KRAJAEJUN et al., 2011). A sequência genômica de *P. insidiosum*, um recurso crucial para explorar patogenicidade, também ainda não está disponível. Contudo, Krajaejun et al. (2011) reportaram 486 marcadores de sequência genética (“expressed sequence tags”), identificando 217 unigenes, dos quais 144 tinham sequência similar com genes conhecidos. Fatores de virulência potenciais incluem genes envolvidos com sistema antioxidante, adaptação térmica, imunomodulação e absorção de ferro e esterol. Em particular, a descoberta de um gene decodificador da ferroquelatase, uma enzima requerida na biossíntese do heme e que é considerada um importante fator de virulência microbiana (ALMIRÓN et al., 2001), despertou o interesse na importância do metabolismo de ferro em *P. insidiosum*.

1.2 Pitiose

1.2.1 Epidemiologia

A pitiose é descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. Não há relatos de transmissão direta entre os animais e dos animais para o homem (GAASTRA et al., 2010). Embora a doença acometa diferentes espécies de mamíferos, incluindo os humanos, existem algumas particularidades na prevalência da doença nas diferentes regiões. A grande maioria dos casos em humanos é observada no sudeste asiático, em particular na Tailândia (THIANPRASIT;

CHAIPRASERT; IMWIDTHAYA, 1996; KRAJAEJUN et al., 2006b). Casos em equinos têm sido reportados na Oceania (MILLER; CAMPBELL, 1982), África (MOSBAH et al., 2012) e América Central (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Na América do Norte predominam os casos em cães (FISCHER et al., 1994; GROOTERS, 2003) e equinos (MENDOZA, 2005; WHITE et al., 2008), enquanto que na América do Sul são quatro as espécies mais comumente afetadas: bovinos (SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; SANTOS, 2012), ovinos (SANTURIO et al., 2008; PESSOA et al., 2012; UBIALI et al., 2013), caninos (RODRIGUES et al., 2006; NETO et al., 2009; PEREIRA et al., 2013) e equinos (SANTURIO et al., 2006a; ÁLVAREZ; GARCÍA; GARAY, 2010; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Os fatores predisponentes à pitiose são desconhecidos, sendo a maior parte dos relatos em equinos e cães imunocompetentes (GAASTRA et al., 2010). Como já descrito, os zoósporos têm uma acentuada quimiotaxia frente ao pelo animal, feridas, soluções de continuidade e mucosa intestinal (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). Observou-se microscopicamente a adesão de zoósporos às bordas de cortes de pele, mas dificilmente ao tecido íntegro (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; GROOTERS, 2003). A localização das lesões está diretamente relacionada às partes anatômicas em contato com água contendo zoósporos de *P. insidiosum*. Picadas de insetos são de interesse epidemiológico, já que Schurko et al. (2003) identificou um isolado a partir de uma larva de *Culex* sp. Nesse caso, existe a hipótese da participação de insetos na transmissão da doença, diretamente através de mosquitos infectados ou indiretamente como uma porta de entrada (GAASTRA et al., 2010). Um levantamento epidemiológico da pitiose equina realizado no Pantanal brasileiro mostrou que as lesões são mais frequentes em animais de pele escura ou naqueles que possuem manchas escuras, fato esse particularmente observado em equinos com padrão de pelagem pampa (SANTOS et al., 2013). Dessa forma, as lesões nessas áreas podem ter relação ao comportamento de repasto de tabanídeos, que preferem manchas escuras para realização da hematofagia (BASSI; CUNHA; COSCARÓN, 2000; SANTOS, 2012).

O primeiro diagnóstico de pitiose no Brasil foi realizado por Santos e Londero (1974), através da avaliação histológica de lesões tumorais no tecido subcutâneo de equinos no Rio Grande do Sul. Desde então, a enfermidade foi descrita em bovinos (GRECCO et al., 2009; GABRIEL et al., 2008), ovinos (SANTURIO et al., 2008;

PORTELA et al., 2010; CARRERA et al., 2013; UBIALI et al., 2013), caninos (NETO et al., 2009; FERNANDES et al., 2012; PEREIRA et al., 2013), muares (SANTOS, 2012) e em um homem adulto após ferimento na perna associado com atividades de lazer na água (BOSCO et al., 2005). Mas é em equinos que a doença tem sua maior importância socioeconômica. Baseado nas vendas de um produto imunoterapêutico para tratamento da pitiose equina (MORAES et al., 2013) e em dados da literatura (SANTURIO et al., 2006a; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS, 2012), estima-se que haja casos em todos os estados brasileiros. O Pantanal brasileiro é considerado o local com maior frequência de pitiose equina no mundo (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; LEAL et al., 2001), com uma prevalência média de 5% (SANTOS et al., 2013). Levando-se em consideração apenas a região do Pantanal, com cerca de 120.000 equídeos (IBGE, 2007), a estimativa dos custos associados com a perda de equídeos relativos ao ano de 2011 é de aproximadamente R\$ 15.500.000 (MORAES et al., 2013).

A enfermidade recebe diversas denominações entre os países e até mesmo entre as regiões do Brasil. Muitos dos nomes populares fazem referência ao aparecimento da doença após o período chuvoso, com a formação de campos alagados, e às estações mais quentes, favoráveis ao desenvolvimento do agente em banhados e lagoas (MILLER; CAMPBELL, 1982). Na Índia é conhecida por “bursatee”, em analogia ao aparecimento dos casos no início da estação chuvosa. Nos EUA e Austrália é chamada de ficomicose equina, câncer dos pântanos, ferida do verão e sanguessuga da Flórida. No Japão é conhecida por dermatite granular e na América Latina também é chamada de “espundia” (GAASTRA et al., 2010; ÁLVAREZ; VILORIA; AYOLA, 2013). No Brasil a terminologia varia conforme a espécie acometida em determinada região, sendo conhecida por “formigueiro” nos casos em equinos no Rio de Janeiro (CARVALHO; LEMOS; REIS JR et al., 2000) e “focinho de touro” nos casos de infecção rinofacial em ovinos na Paraíba (RIET-CORREA et al., 2008). No Pantanal, a pitiose equina é chamada de “ferida da moda” ou “ferida brava”, em menção ao aumento do número de casos após o ápice das cheias (LEAL et al., 2001; SANTOS, 2012).

1.2.2 Patogenia

Avanços significativos no entendimento da patogenia da doença foram alcançados na última década. Mesmo assim, diversas questões incluindo quando e por qual razão esse oomiceto desenvolveu a capacidade de infectar mamíferos permanecem sem respostas. Duas razões são tidas como fundamentais para tal quadro, a ausência do sequenciamento genômico completo de *P. insidiosum* e de modelos experimentais além da espécie cunícula (GAASTRA et al., 2010; AZEVEDO et al., 2012).

Tem sido postulado que *P. insidiosum* utiliza o tropismo por tecidos vegetais ou de mamíferos para localizar lesões nas quais os zoósporos possam iniciar a infecção. Uma vez que o zoósporo entra em contato com o hospedeiro mamífero, ele perde os flagelos, encista e secreta uma substância adesiva que o mantém aderido à pele, aumentando sua chance de sobrevivência (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993; MENDOZA; VILELA, 2013). Estimulado pela temperatura corporal, ocorre o desenvolvimento de um tubo germinativo que penetra nos tecidos dando início à infecção (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). A necessidade de lesão prévia para dar início à infecção é questionada por Santurio et al. (1998), que encontraram hifas no interior de folículos pilosos de bovinos com pitiose. Estudos nesse sentido foram realizados por Ravishankar et al. (2001) e MacDonald et al. (2002), que demonstraram que a força exercida pelo ápice das hifas não é suficiente para penetrar a pele intacta. Em contrapartida, os autores demonstraram uma redução significativa da resistência tecidual através da secreção de proteases, que foram mais tarde identificadas sendo serina proteases (DAVIS et al., 2006). As lesões têm caráter invasivo e crescem de forma exponencial. Caso não sejam adequadamente tratadas nos estágios iniciais tendem a levar o hospedeiro à morte.

Acredita-se que muitos hospedeiros mamíferos são resistentes à infecção por *P. insidiosum*, e somente alguns desenvolvem infecções que variam conforme o hospedeiro. As formas cutânea, subcutânea, ocular ou sistêmica são mais comuns em humanos (THIANPRASIT; CHAI PRASERT; IMWIDHAYA, 1996; PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; KRAJAEJUN et al., 2006b), enquanto que as formas cutânea/subcutânea e gastrointestinal são mais comuns em animais

(MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO; LEAL; MONTEIRO, 2003; MENDOZA, 2005; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). É possível que uma resposta imune incipiente adequada possa controlar e eliminar o patógeno dos tecidos (MENDOZA; VILELA, 2013). Essa hipótese é fundamentada pela ocorrência de poucos casos em humanos e animais em áreas endêmicas. Segundo Mendoza e Newton (2005), é possível que mamíferos susceptíveis à infecção por *P. insidiosum* sejam portadores de defeitos genéticos relacionados a receptores-chave da resposta imune. Corroborando com essa afirmação a ocorrência de reinfecção em animais tratados com sucesso e que voltaram a desenvolver pitiose após um período livre da infecção (SANTOS et al., 2011a).

1.2.3 Imunologia

Caso *P. insidiosum* não tenha sido eliminado após uma resposta imune inicial, uma vez nos tecidos, as hifas liberam exoantígenos que provocam uma resposta imune com estimulação da subpopulação de linfócitos Th2, e, portanto, com presença de eosinófilos, mastócitos, IgE, interleucina (IL)-4, IL-10 e IL-5 (THITITHANYANONT et al., 1998; MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005; GAASTRA et al., 2010). A presença desse tipo de imunidade, *i.e.*, humoral, não é capaz de eliminar o agente dos tecidos. Além disso, a grande quantidade de eosinófilos degranulados, que provoca a reação semelhante à de Splendore-Hoeppli, e mastócitos em torno das hifas é responsável pelas lesões observadas nos tecidos (MENDOZA; ALFARO, 1986; MARTINS et al., 2011).

Levando em consideração que enzimas do sistema purinérgico estão intimamente envolvidas na modulação do sistema imune, Bach et al. (2010) demonstraram que ocorre um aumento na atividade da enzima nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) em relação à hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP), sem alterações na hidrólise de difosfato de adenosina (ADP), em linfócitos de coelhos infectados experimentalmente com *P. insidiosum*. Conseqüentemente, espera-se uma diminuição na concentração de ATP extracelular, resultando em estimulação da resposta imune do tipo Th2, aumento da produção de IL-4 e ativação de eosinófilos e mastócitos.

Considerando a importância da participação de nucleotídeos de adenina na imunorregulação do sistema imune e na formação de adenosina, um nucleosídeo que exerce forte ação anti-inflamatória e imunossupressora através da inibição da proliferação de linfócitos T e da secreção de citocinas (ANTONIOLI et al., 2012), Bach et al. (2013) avaliaram a atividade de ecto-adenosina deaminase (E-ADA) em linfócitos de coelhos com pitiose experimental. Os resultados mostram que a atividade dessa enzima estava reduzida, enquanto que as concentrações de seu substrato adenosina estavam elevadas no soro dos animais doentes. Em altas concentrações, como no caso de processos inflamatórios, a adenosina inibe a resposta imunológica celular, diminuindo os níveis de interferon-gama (IFN- γ), IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), corroborando com a hipótese de desenvolvimento de uma resposta imune Th2 nos casos de pitiose (MENDOZA; NEWTON, 2005).

1.2.4 Pitiose em espécies domésticas

A espécie equina é a mais afetada, principalmente nas formas cutânea e subcutânea. As lesões ocorrem com maior frequência nas extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toracoabdominal, principalmente por serem regiões anatômicas com maior contato com águas contaminadas por zoósporos (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Entretanto, as lesões também podem ser observadas na cabeça (PIEREZAN et al., 2009; SANTOS et al., 2011b), podendo ocorrer disseminação para linfonodos regionais, ossos adjacentes e pulmões (REIS JR et al., 2003; GAASTRA et al., 2010).

Estudos avaliando a prevalência de dermatopatias em equinos no estado do Rio Grande do Sul reportaram que a pitiose ficou em terceiro (SOUZA et al., 2011) e quarto lugares (BIANCHI, 2013). A prevalência de pitiose entre os tumores cutâneos diagnosticados em equinos nesses estudos foi de 8,3% e 5,7%, respectivamente. Contudo, a prevalência da doença no estado é desconhecida. Já no Pantanal brasileiro, região em que a pitiose equina é considerada endêmica, a prevalência da doença entre os animais entre os anos de 2007 e 2010 foi de 5,4% (SANTOS et al.,

2013). Os índices de mortalidade e letalidade atingiram 1,15 e 23,1%, respectivamente, os quais podem estar subestimados devido ao tratamento de alguns animais. Corrobora com esses dados o estudo retrospectivo sobre causas de morte ou razões para eutanásia de equinos realizado por Pierezan et al. (2009), que reportou 3,6% de casos (morte ou eutanásia) envolvendo pitiose em um intervalo de 40 anos no Rio Grande do Sul.

O período de incubação da doença em equinos não é bem conhecido, mas estudos epidemiológicos (MARCOLONG-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2013) e estudos experimentais em coelhos (PEREIRA et al., 2008b) estimam de que seja de alguns dias a aproximadamente um mês. As lesões crescem de forma exponencial, formando grandes massas teciduais, de bordas irregulares e aparência tumoral (SALLIS; PEREIRA; RAFFI, 2003; SANTURIO et al., 2006a; MOSBAH et al., 2012). A histopatologia da pele de equinos afetados revela a presença de úlceras recobertas por fibrina, neutrófilos e colônias bacterianas. A derme e o subcutâneo demonstram uma dermatite e celulite eosinofílica com formação de tecido de granulação (MARTINS et al., 2011). Há intenso prurido e corrimento serossanguinolento a partir de orifícios (*sinus*), os quais podem conter em seu interior massas branco-amareladas conhecidas internacionalmente como “kunkers” (MILLER; CAMPBELL, 1984). Macroscopicamente, os “kunkers” têm diversos formatos, apresentam uma consistência firme e variam em tamanho desde um grão de arroz até alguns centímetros (GAASTRA et al., 2010). Microscopicamente, os “kunkers” são formados por densas coleções de eosinófilos, muitos dos quais desgranulados, entremeados por trabéculas esparsas de colágeno e hifas viáveis. A presença de um vaso sanguíneo no interior dos “kunkers” também é comum (GAASTRA et al., 2010; MARTINS et al., 2011). Na maioria dos casos ocorre somente uma lesão, de caráter ulcerativo, embora casos atípicos de lesões circunscritas por tecido epitelial e de animais com mais de uma lesão tenham sido relatados (LEAL et al., 2001; SANTOS et al., 2013). O desfecho mais comum é que, com a evolução da doença, ocorra uma intensa anemia e hipoproteinemia devido à perda de exsudatos pela lesão, culminando com a morte do animal (MENDOZA; ALFARO, 1986). Os casos relatados da forma intestinal da pitiose em equinos descrevem a presença de massas tumorais, obstrução do lúmen intestinal e áreas disseminadas de ulceração do epitélio (BROWN; ROBERTS, 1988; PURCELL et al., 1994).

É importante salientar que, tanto quanto os equinos, os muares (*Equus asinus*) também desenvolvem a doença. Casos de lesões granulomatosas subcutâneas, inclusive com a presença de “kunkers”, foram relatados no Pantanal brasileiro (SANTOS et al., 2013) e na Colômbia (ÁLVAREZ; VILORIA; AYOLA; 2013).

A segunda espécie animal mais acometida por *P. insidiosum* no mundo é a canina. Tal quais os equinos, os cães apresentam a forma cutânea da doença, embora a forma gastrointestinal seja a mais prevalente (SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2013). A maior parte dos casos ocorre em cães jovens, de raças grandes e que têm contato com áreas contendo açude ou banhados (MCLAUGHLIN; AYER, 1995; DYKSTRA et al., 1999; GROOTERS, 2003; BERRYESSA et al., 2008; KROCKENBERGER et al., 2011). Dada a afinidade de *P. insidiosum* pelo epitélio lesado, faz sentido assumir que animais com lesões cutâneas ou gastrintestinais causadas por parasitas estejam mais propensos a adquirir a doença (GROOTERS, 2003; NETO et al., 2010).

Na forma gastrintestinal, os sinais clínicos incluem êmese, perda de apetite e de peso, diarreia intermitente e massas palpáveis no abdômen (GROOTERS, 2003; RODRIGUES et al., 2006; BERRYESSA et al., 2008; PEREIRA et al., 2013). Achados laboratoriais incluem anemia, eosinofilia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (GROOTERS, 2003; BERRYESSA et al., 2008). Os achados de necropsia incluem aumento dos linfonodos mesentéricos, espessamento das paredes do estômago e intestino e presença de grandes massas (RODRIGUES et al., 2006; TROST et al., 2009). Histologicamente, essas lesões se caracterizam por terem um padrão necro-eosinofílico, com áreas de necrose semelhante as dos “kunkers” em equinos, ou granulomatoso (às vezes piogranulomatoso), consistindo de macrófagos epitelioides e células de Langhans (MARTINS et al., 2011). Há relatos também de infecção envolvendo o esôfago, o cólon e a próstata (SANTURIO et al., 2006a; BERRYESSA et al., 2008). A ocorrência de ambos os padrões concomitantemente ou individualmente é observada tanto nas lesões gastrintestinais quanto nas cutâneas. Na coloração de hematoxilina e eosina é comum a observação de reações semelhante à de Splendore-Hoeppli, visualizando-se hifas de *P. insidiosum* no interior das lesões através da coloração com sais de prata (RODRIGUES et al., 2006; TROST et al., 2009; MARTINS et al., 2011)

As lesões cutâneas geralmente se localizam nas extremidades, região dorsal próximo à base da cauda, períneo e face, aumentam rapidamente de tamanho, ulceram e apresentam múltiplos tratos fistulosos (DYKSTRA et al., 1999;) Na maioria dos relatos ocorre uma única lesão, indolor, não pruriginosa, com linfadenomegalia regional (DYKSTRA et al., 1999; NETO et al., 2010). Prurido e lesões disseminadas foram encontrados em um único relato em cães (FOIL et al., 1994).

O primeiro caso de pitiose em ovinos foi reportado no Brasil por Tabosa et al. (2004). Os animais afetados em dois surtos na região nordeste apresentaram lesões ulcerativas úmidas ou secas, localizadas nos membros, região ventral do abdômen e região pré-escapular. A forma gastrointestinal também foi descrita no país (PESSOA et al., 2012). No entanto, rinite granulomatosa, principalmente na forma rinofacial (UBIALI et al., 2013), é a mais frequente, com sinais clínicos como epistaxe bilateral, inchaço da região nasal, lábios e pele adjacente (SANTURIO et al., 2008). Com a cronicidade pode haver deformação e destruição dos ossos da cavidade nasal e necrose caseosa dos linfonodos retrofaríngeos (SANTURIO et al., 2008).

O número de casos de pitiose em ovinos pode ser maior do que os relatados, principalmente pela dificuldade do diagnóstico diferencial com casos de conidiobolomicose (BOABAID et al., 2008; RIET-CORREA et al., 2008). A implantação de novas técnicas de diagnóstico deverá fornecer dados reais da prevalência da doença nessa espécie (UBIALI et al., 2013).

A pitiose em bovinos é pouco frequente, podendo ocorrer durante a temporada de chuvas em áreas tropicais, embora um surto epizootico com mais de 60 animais tenha sido relatado na Venezuela (PÉREZ et al., 2005). Há relatos também nos EUA (MILLER; OLCOTT; ARCHER, 1985), no Pantanal (SANTURIO et al., 1998; SANTOS et al., 2011a) e na região sul do Brasil (GRECCO et al., 2009; GABRIEL et al., 2008). Estima-se que a incidência de pitiose em equinos seja 57 vezes maior do que em bovinos, fato que pode estar associado ao comportamento dos bovinos de não se manterem em campos alagadiços (SANTOS et al., 2011c).

As lesões são geralmente observadas nos membros, uni ou multifocais, com superfícies planas, hemorrágicas, úmidas e brilhantes, ocorrendo prurido e claudicação em alguns animais (GABRIEL et al., 2008; SANTOS et al., 2011c). Também é relatada a ocorrência de contaminação bacteriana secundária (PÉREZ et al., 2005). Histologicamente, observa-se piogranulomas contendo eosinófilos e neutrófilos, granulomas discretos contendo poucas hifas no interior dos mesmos e

múltiplos focos de necrose contendo eosinófilos, neutrófilos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes (MILLER; OLCOTT; ARCHER, 1985; SANTURIO et al., 1998; MARTINS et al., 2011; SANTOS et al., 2011c).

Um fato peculiar na pitiose bovina é a autocura dos animais (SANTURIO et al., 1998; GABRIEL et al., 2008; SANTOS et al., 2011c). A diferença no curso clínico entre bovinos e as outras espécies afetadas pode ser atribuída à natureza menos eosinofílica da resposta inflamatória frente ao micro-organismo (GABRIEL et al., 2008; MARTINS et al., 2011; SANTOS et al., 2011c), visto que não há diferenças genotípicas entre os isolados de *P. insidiosum* obtidos de diferentes hospedeiros dentro da mesma região geográfica (BOSCO et al., 2008).

Relatos em gatos são raros e geralmente compreendem lesões cutâneas ou subcutâneas (THOMAS; LEWIS, 1998; GROOTERS, 2003). A literatura ainda descreve um caso de infecção nasal e retrobulbar (BISSONNETTE et al., 1991) e dois casos de infecção gastrointestinal, com apresentação similar aos observados em cães (RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005).

1.2.5 Pitiose em espécies não domésticas

Um número crescente de mamíferos não domésticos vem sendo diagnosticado com pitiose. O primeiro relato aconteceu em um grupo de ursos de um zoológico nos EUA (GROOTERS, 2003). No ano seguinte, Camus et al. (2004) observaram lesões pulmonares causadas por *P. insidiosum* em uma onça, que acabou morrendo devido à doença. No mesmo ano, a doença foi reportada em um camelo com lesões granulomatosas na face (WELLEHAN et al., 2004), espécie a qual voltou anos mais tarde a apresentar casos na forma vulvar (VIDELA et al., 2011). E por fim, Buergelt et al. (2006) diagnosticaram pitiose em um tigre-de-bengala através de métodos sorológicos.

Somente um caso foi relatado em animais não mamíferos, por Pesavento et al. (2008), que descreveram um caso de pitiose em caraúna (*Plegadis chihi*), uma ave migratória com hábito aquático da família dos tresquiornítídeos. Além disso, *P. insidiosum* foi isolado da larva de um mosquito (SCHURKO et al., 2003).

1.2.6 Pitiose em humanos

A apresentação da doença em humanos ocorre de forma diferente da observada nos animais. Segundo Krajaejun et al. (2006b), em um total de 102 casos de pitiose humana na Tailândia, 59% foram do tipo vascular, 33% ocular, 5% cutânea/subcutânea e 3% do tipo disseminada, com invasão dos órgãos internos. As diferenças observadas parecem estar relacionadas com o tipo de resposta desencadeada pelo hospedeiro, pois humanos e animais são infectados por um genótipo em comum de *P. insidiosum* (BOSCO et al., 2008).

A pitiose é considerada uma doença grave em humanos, de difícil tratamento, levando principalmente à enucleação, amputação e até mesmo à morte (IMWIDTHAYA, 1994; IMWIDTHAYA, 1995; LAOHAPENSANG et al., 2009). Embora o diagnóstico precoce seja fundamental por causa das altas taxas de morbidade e mortalidade associadas à doença, este geralmente é complicado devido à falta de lesões patognomônicas, desconhecimento da doença pelos profissionais e padrões clínicos e histológicos que confundem o agente com fungos como zigomicetos, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (KAUFMAN, 1998; MENDOZA; PRASLA; AJELLO, 2004).

Apesar do longo histórico de doença em animais, os primeiros casos de pitiose em humanos só foram reportados recentemente na Tailândia, onde a doença é considerada endêmica (THIANPRASIT, 1986; KRAJAEJUN et al., 2006b). A doença está relacionada ao trabalho agrícola em plantações alagadiças, locais ideais para o desenvolvimento dos zoósporos móveis que se favorecem de uma lesão na pele para desencadear a invasão tecidual (PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003). Inclusive, o patógeno já foi isolado de amostras ambientais obtidas em áreas agricultáveis na Tailândia (SUPABANDHU et al., 2008). A infecção em pacientes com as formas ocular ou cutânea/subcutânea se dá através do contato direto com o agente. Em pacientes com pitiose disseminada, as diferentes apresentações clínicas refletem diferentes rotas de invasão, como a gastrointestinal e rinocerebral. Já em pacientes com pitiose vascular, as extremidades inferiores geralmente são as mais acometidas, pelo fato da maior exposição ao agente (KRAJAEJUN et al., 2006b).

As formas localizadas da doença ocorrem em indivíduos hígidos, e a forma ocular geralmente culmina com perda da visão ou enucleação, o que demonstra a

natureza agressiva da doença. As formas sistêmica e vascular são ainda mais severas, e geralmente ocorrem em pacientes com talassemia, anemia aplástica ou hemoglobinúria paroxística noturna (SATHAPATAYAYONGS et al., 1989; PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; WANACHIWANAWIN et al., 2009). A forma vascular cursa com infecção ascendente e trombose das artérias principais, culminando em isquemia e gangrena do membro acometido (SANGRUCHI et al., 2013). No estudo de KRAJAEJUN et al. (2006b), 90% dos pacientes com essa última forma da doença eram talassêmicos, sugerindo uma estreita relação entre as duas doenças.

Estima-se que 1% da população da Tailândia (600.000 indivíduos) tenha talassemia, mas que pelo menos 40% sejam portadores de um gene anormal da hemoglobina (PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; KRAJAEJUN et al., 2006b). Embora defeitos imunológicos ou fagocíticos nesses pacientes possa ser uma possível causa da susceptibilidade à pitiose, alguns estudos não confirmam tal fato (PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003). A talassemia é uma doença hereditária autossômica recessiva que resulta na redução da taxa de síntese de uma das cadeias de globina que formam a hemoglobina, principalmente as cadeias α ou β . Dependendo do tipo, pode desencadear anemia microcítica hipocrômica leve ou severa, resultado da destruição extravascular do eritrócito (FIGHERA, 2001). Essa destruição resulta na liberação do ferro contido no eritrócito, e com o tempo o paciente acaba desenvolvendo uma sobrecarga de ferro sistêmica, com saturação da transferrina invariavelmente alta (PAIVA; RONDÓ; GUERRA-SHINOHARA, 2000). Esse quadro é responsável por promover a infectividade de patógenos e comprometer a resposta imune (MENCACCI et al., 1997; ; PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; OZMENT; TURI, 2009; RIVELLA, 2009). Contudo, seis pacientes com pitiose no estudo de Krajaejun et al. (2006b) cursavam com hemoglobinúria paroxística noturna e sua deficiência de ferro associada. Dessa forma, a sobrecarga de ferro sozinha pode não explicar o aumento da susceptibilidade à infecção, mas sabe-se que tanto a talassemia quanto a hemoglobinúria paroxística noturna causam hemólise crônica. Investigações adicionais são requeridas para identificar quais fatores são predisponentes à pitiose. A existência de um ou mais fatores é reforçada pelo relato de Santos et al. (2011a), em que a doença tende a se desenvolver nos mesmos equinos dentro de um grupo exposto às mesmas condições.

Casos esporádicos de pitiose têm sido relatados em outros países. Nos EUA, Shenep et al. (1998) relataram um caso de infecção ocular em um menino com histórico de atividade de lazer em uma área com água estagnada, e Schloemer et al. (2012) descreveram um caso fatal de pitiose disseminada em uma adolescente com anemia de Diamond-Blackfan. No histórico desse último caso consta que a paciente desenvolveu hemossiderose por ter descontinuado o tratamento com o quelante de ferro prescrito devido às constantes transfusões sanguíneas, além de ter entrado em contato com água parada de um açude e ingerido água de poças em cavernas. Outros casos também foram reportados na Austrália, Haiti, Malásia e Nova Zelândia (GAASTRA et al., 2010), além do caso descrito anteriormente de infecção subcutânea em um adulto no Brasil (BOSCO et al., 2005).

1.2.7 Modelos experimentais

Espécies animais frequentemente diagnosticadas com pitiose são resistentes à infecção experimental por *P. insidiosum* (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Na verdade, o único modelo animal na pitiose experimental é o coelho (SANTURIO et al., 2003; GAASTRA et al., 2010). O primeiro pesquisador a reproduzir a doença em coelhos foi WITKAMP, em 1924. Ele induziu granulomas eosinofílicos nos coelhos após injeções intraperitoneais ou intravenosas de hifas de *P. insidiosum* isoladas de equinos com pitiose cutânea. Os mesmos resultados foram obtidos com a inoculação de “kunkers” sob os tecidos dos animais. Miller e Campbell (1983) foram os primeiros a incriminar os zoósporos deste oomiceto como unidades infectantes. Assim, utilizaram estes zoósporos para reproduzir a infecção em um grupo de coelhos hígidos e em um grupo de coelhos tratados com corticoide. Ambos os grupos adquiriram a doença, comprovando então que *P. insidiosum* pode desencadear a doença em animais imunocompetentes. O mesmo não ocorre utilizando-se equinos, bovinos, caninos, felinos, ratos ou camundongos como modelos experimentais (MENDOZA; VILELA, 2013). Os dados coletados nesses estudos sugerem que os zoósporos, bem como outros propágulos de *P. insidiosum*, podem requerer elementos até então desconhecidos para iniciar a infecção quando em contato com o tecido de mamíferos (MENDOZA; NEWTON, 2005).

1.2.8 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de pitiose é realizado levando-se em consideração a epidemiologia, sinais clínicos e aspectos macro e microscópicos das lesões. Já o diagnóstico definitivo pode ser obtido de três formas: a) determinação da presença do agente em microscopia direta e cultivo; b) detecção de anticorpos anti-*P. insidiosum* através de métodos sorológicos; e c) detecção do DNA do agente infeccioso nos tecidos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior sequenciamento (GAASTRA et al., 2010). Cabe ressaltar que a ausência de esporulação de *P. insidiosum* em meio de cultura sólido leva a uma grande dificuldade na identificação do agente causal, havendo muitos relatos errôneos ou equivocados (KIEHN, 2003; MENDOZA; VILELA, 2009). Da mesma forma, a citologia e histologia podem auxiliar no diagnóstico, mas requerem uma atenção maior na diferenciação entre pitiose e mucormicose ou lagenidiose (MENDOZA; VILELA, 2013).

O isolamento e a identificação do agente são de grande valor para o diagnóstico definitivo e diferencial, uma vez que a pitiose em equinos deve ser diferenciada de habronemose cutânea, mucormicoses (especialmente conidiobolomicose e basidiobolomicose), neoplasias, como carcinoma de células escamosas e sarcoide, tecido de granulação exuberante e granulomas bacterianos (CHAFFIN et al., 1995; GROOTERS et al., 2002; SANTOS et al., 2010). Já em caninos, o diagnóstico diferencial deve incluir infecções causadas por zigomicetos e oomicetos do gênero *Lagenidium* (GROOTERS, 2003; MENDOZA; VILELA, 2009). Em ovinos, especialmente as lesões nasais, devem ser diferenciadas de conidiobolomicose (BOABAID et al., 2008; RIET-CORREA et al., 2008; UBIALI et al., 2013). Em humanos a pitiose deve ser diferenciada de lagenidiose (REINPRAYOON et al., 2013), mucormicose, aspergilose e peniciliose (MENDOZA; PRASLA; AJELLO, 2004; BOSCO et al., 2005).

O transporte de fragmentos de tecidos para isolamento microbiano deve ser realizado em temperatura ambiente, visto que *P. insidiosum* é sensível ao frio (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; GAASTRA et al., 2010). Contudo, um dos pontos-chaves para o isolamento é evitar a contaminação bacteriana através do uso de antibióticos (GROOTERS et al., 2002; SANTURIO et al., 2006a). Em equinos, o

isolamento do agente através do cultivo dos “kunkers” é relativamente fácil; já em outras espécies a taxa de resultados falso-negativos é variável, devendo-se utilizar-se outros métodos de diagnóstico (GROOTERS et al., 2002; SANTOS, 2012).

Os meios de cultivo mais utilizados para o isolamento de *P. insidiosum* são o ágar e o caldo Sabouraud, podendo ser acrescidos de antibióticos. Colônias hialinas típicas de *P. insidiosum* podem ser observadas após a incubação dos meios a 37 °C por 24-48 h (GAASTRA et al., 2010). Para produção das estruturas reprodutivas assexuadas que possibilitam a identificação, deve-se realizar a técnica de zoosporogênese, que consiste na infecção de gramas por *P. insidiosum* em meio de cultura sólido, geralmente ágar farinha de milho, e posterior incubação em uma solução contendo sais minerais (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2008a). Zoosporângios contendo zoósporos móveis são observados nos bordos terminais das folhas, após duas a quatro horas de incubação a 37 °C (GAASTRA et al., 2010).

A visualização do agente em cortes histológicos pode ser realizada através da coloração de prata (Gomori-Grocott). Contudo, deve-se levar em consideração a semelhança com fungos Mucorales ou Entomoftorales (GAASTRA et al., 2010; UBIALI et al., 2013). Para confirmar os resultados histológicos tem-se utilizado a técnica de imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*P. insidiosum* (GABRIEL et al., 2008; MARTINS et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). Igualmente, a coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) pode auxiliar no diagnóstico, visto que as hifas de *P. insidiosum* não se coram nesse método histopatológico devido à ausência de quitina na parede celular (MARTINS et al., 2011).

A identificação correta do agente etiológico não é uma tarefa simples, requerendo pessoal com conhecimento laboratorial. Além disso, muitas vezes o isolamento pode demorar alguns dias ou até mesmo não ser possível. Nesse sentido, diversos métodos sorológicos têm sido pesquisados para dar maior acurácia e agilidade ao resultado, favorecendo o início rápido do tratamento (CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013). Testes de sorodiagnóstico incluem imunodifusão (MENDOZA; KAUFMAN; STANDARD, 1986), Western blot (MENDOZA; NICHOLSON; PRESCOTT, 1992; LEAL et al., 2005; KRAJAEJUN et al., 2006a) , imunoensaio enzimático (ELISA) (SANTURIO et al., 2006b; KEERATIJARUT et al., 2013) e hemaglutinação (JINDAYOK et al., 2009). Além disso, a rapidez do diagnóstico teve uma melhora significativa com o uso da imunocromatografia, a qual utiliza filtrados obtidos a partir de culturas de *P.*

insidiosum, anticorpos humanos anti-*P. insidiosum* e imunoglobulina G-coloidal de ovino conjugada ao ouro coloidal (KRAJAEJUN et al., 2009). A imunocromatografia é um método rápido, de fácil execução e confiável para o diagnóstico de infecções por fungos e oomicetos, tendo a vantagem de poder ser realizada até mesmo a campo, junto ao paciente (THORNTON; WILLS, 2013).

Técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para a identificação laboratorial de *P. insidiosum* na ausência de cultura. Um método de diagnóstico específico através da Nested PCR usando a região do espaço transcrito interno (ITS-1) do gene RNAr de *P. insidiosum* como alvo de amplificação foi desenvolvida por Grooters e Gee (2002). Contudo, pelo fato da maior parte das amostras de lesões de pele ou intestinais estarem contaminadas com micróbios ambientais que não têm sequência de DNA depositada em bancos de dados, o diagnóstico baseado somente no peso molecular específico de amplicons deve ser interpretado com cuidado (GAASTRA et al., 2010).

A partir de então diversos laboratórios têm utilizado e melhorado técnicas moleculares. Schurko et al. (2004) desenvolveram uma sonda de DNA espécie-específica elaborada a partir da região do espaçador intergênico (IGS-1), situada entre os genes LSU e 5S RNAr de *P. insidiosum*. Os resultados mostram que a técnica foi capaz de distinguir o agente de outras espécies de *Pythium* e de outros patógenos que causam doenças com sintomas similares à pitiose. Botton et al. (2011) demonstraram que a técnica de Nested PCR foi capaz de identificar *P. insidiosum* diretamente de lesões experimentais em coelhos e de lesões de equinos infectados naturalmente, além de ser uma ferramenta útil para a identificação e caracterização de espécimes de *P. insidiosum* isolados em meios de cultura. A técnica é baseada na utilização da PCR primeiramente para amplificar a região ITS1, 5.8s e ITS2, seguido de uma segunda PCR utilizando-se primers específicos para *P. insidiosum*. Essa técnica também se mostrou eficaz para diagnosticar *P. insidiosum* em cortes histológicos embebidos em parafina (SALIPANTE et al., 2012). Corroborando com esses achados o estudo de Bosco et al. (2008), o qual demonstrou que através do sequenciamento da região 5.8-5S do DNAr foi possível comprovar que humanos e animais são infectados por um genótipo em comum de *P. insidiosum*. Recentemente, Thongsri et al. (2012) observaram que o limite de detecção da técnica de Nested PCR em tubo único foi de 2,7 pg de DNA,

correspondendo a 21 zoósporos. Dessa forma os autores concluíram que cada zoósporo contém aproximadamente 129 fg de DNA.

1.2.9 Tratamento cirúrgico e quimioterápico

O tratamento de infecções causadas por *P. insidiosum* em animais e humanos é complicado pelas características singulares do agente. Os oomicetos diferem dos fungos verdadeiros na produção de zoósporos móveis e na composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto *Pythium* spp. contém celulose e β -glucanas. A membrana plasmática não contém esteroides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas (HENDRIX, 1964). Devido a essas características, não existe droga antifúngica eficiente contra *P. insidiosum* (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989; SANTURIO et al., 2003). Associado a esse fato, em muitos casos o sucesso das terapias também pode ser influenciado pelo tamanho e tempo da lesão, idade e estado nutricional do paciente (SANTURIO et al., 2006a; MONTEIRO, 1999; SANTOS, 2012). Três métodos terapêuticos são frequentemente utilizados no tratamento da pitiose: cirurgia, quimioterapia e imunoterapia (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996).

Cirurgia radical, incluindo amputação, ainda é o método de tratamento mais utilizado e efetivo em humanos e animais com pitiose (LAOHAPENSANG et al., 2009; GAASTRA et al., 2010; SANGRUCHI et al., 2013). O debridamento cirúrgico de lesões de pele de cães e equinos é bastante popular (GAASTRA et al., 2010; SANTOS et al., 2011a), embora as taxas de recidiva sejam elevadas (aproximadamente 45%). Para evitá-las, a intervenção cirúrgica requer a retirada de toda a região afetada, o que não é possível quando as lesões envolvem áreas anatômicas delicadas, assim como a região ventral do abdômen, membros e ossos (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995).

Por ter sido inicialmente classificado como um fungo, diversos agentes que atuam na síntese de ergosterol, como os azólicos itraconazol, cetoconazol, miconazol e fluconazol, e outros que promovem mudanças na membrana plasmática, como a terbinafina e a anfotericina B, foram utilizados em pacientes

diagnosticados com a doença (GAASTRA et al., 2010). Era de se esperar que *P. insidiosum* não fosse susceptível a esses fármacos. Contudo, há relatos de cura clínica em pacientes (BISSONNETTE et al., 1991; TRISCOTT; WEEDOM; CABANA, 1993, SHENEP et al., 1998; GROOTERS, 2003). Esses achados motivaram a realização de diversos estudos *in vitro* e *in vivo* com fármacos de diferentes classes terapêuticas.

Argenta et al. (2008) verificaram a susceptibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente ao itraconazol, voriconazol e à terbinafina. Os resultados mostram que, quando utilizados sozinhos, os fármacos não apresentaram atividade frente aos isolados. Contudo, a terbinafina quando associada ao voriconazol ou ao itraconazol apresentou sinergismo em 17% dos isolados. Infelizmente, os resultados em modelos experimentais *in vivo* não foram satisfatórios (ARGENTA et al., 2012).

Nessa mesma linha de pesquisa, Cavalheiro et al. (2009) verificaram a suscetibilidade *in vitro* de 17 isolados de equinos frente ao antifúngico terbinafina e suas associações com miconazol, fluconazol, cetoconazol, caspofungina, anfotericina B, fluvastatina, rifampicina, ibuprofeno e metronidazol. Sinergismo foi observado com as combinações entre terbinafina e caspofungina (41,18%), anfotericina B (41,18%), fluconazol (41,18%), cetoconazol (29,41%) e miconazol (11,76%). A combinação de terbinafina mais rifampicina e terbinafina mais metronidazol foi indiferente para 94,12% dos isolados. A combinação terbinafina mais ibuprofeno foi indiferente para 82,35%. Antagonismo foi observado em combinações de terbinafina com fluvastatina (35,3%) e rifampicina (5,88%).

Resultados promissores foram encontrados recentemente por Mahl et al (2012) e Loreto et al. (2011), que reportaram boa atividade *in vitro* dos antibióticos tigeciclina e minociclina. Contudo, ainda não há dados de estudos *in vivo*. É fato que as condições *in vitro* não simulam bem o microambiente encontrado *in vivo* no qual as drogas têm concentrações variáveis e interagem com o patógeno na presença de proteínas séricas e de tecidos (ELEFANTI et al., 2013a; 2013b). Esse paradoxo é frequentemente observado na terapia contra pitiose. Estudos *in vitro* sugerem que a anfotericina B não tem atividade contra *P. insidiosum* (SHENEP et al., 1998; CAVALHEIRO et al., 2009), embora haja relatos de humanos com infecção subcutânea na região periorbital que responderam bem ao tratamento com anfotericina B (TRISCOTT; WEEDOM; CABANA, 1993). Outro exemplo interessante é o tratamento de lesões em membros de equino através da perfusão regional de

anfotericina B (DÓRIA et al., 2012). Os autores relataram que, após a remoção cirúrgica do tecido de granulação, 92% (11/12) dos casos foram completamente curados 35 ou 60 dias após uma ou duas aplicações do fármaco, respectivamente. A infusão regional do medicamento permite, além da cura da infecção, evitar os efeitos colaterais causados pela administração sistêmica do medicamento.

1.2.10 Tratamento com equinocandinas

As equinocandinas são grandes moléculas lipopeptídicas que inibem a síntese de β -(1,3)-glucanas através da inibição não competitiva da enzima β (1,3)-D-glucana sintase (DENNING, 2003). A estrutura química das equinocandinas é composta por hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral lipofílica (Figura 1), sendo o acetado de caspofungina o primeiro fármaco desse grupo a estar disponível nos EUA (DERESINSKI; STEVENS, 2003). Posterior à liberação da caspofungina em 2001, outras duas equinocandinas, micafungina e anidulafungina, tornaram-se disponíveis para uso clínico nos anos de 2005 e 2006 (PETRIKKOS; SKIADA, 2007). As equinocandinas têm demonstrado atividade fungicida frente a *Candida* spp. e fungistática frente a *Aspergillus* spp. (PETRAITIS et al., 2002; DIOMEDI, 2004; PASTOR, GUARRO, 2009).

A utilização de caspofungina poderia ser uma alternativa interessante no tratamento das infecções por *P. insidiosum*, visto que esse oomiceto apresenta grande quantidade de β -glucanas na parede celular (HENDRIX, 1964). Com esse intuito, Pereira et al. (2007) avaliaram a suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados de *P. insidiosum* frente à caspofungina e *in vivo* utilizando coelhos com pitiose experimental. Contudo, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) capazes de inibir 100% dos isolados foram elevadas, variando entre 8 e 64 μ g/ml. Além disso, não foi possível observar alterações morfológicas nas hifas, o que constitui a concentração efetiva mínima (CEM), que é considerado um método mais apropriado para avaliar a suscetibilidade frente às equinocandinas (ESPINEL-INGROFF, 2003). Corroborando com esses achados os testes *in vivo*, que demonstraram que a caspofungina tem ação meramente fungistática sobre o oomiceto (PEREIRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008b).

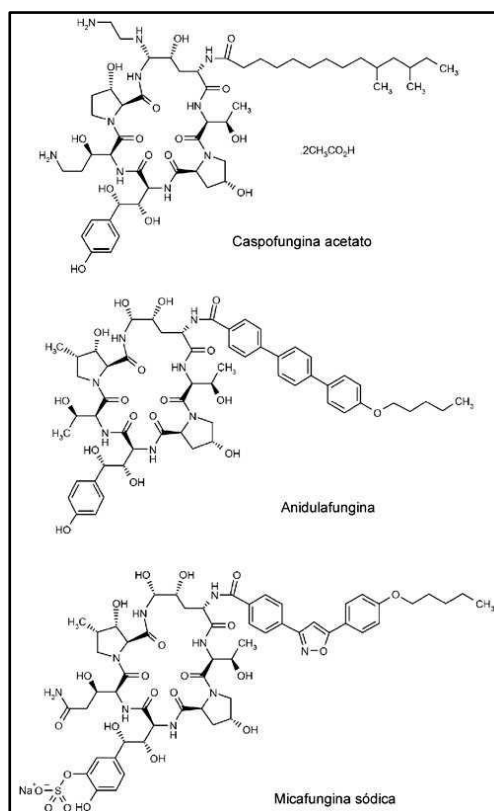


Figura 1 – Estrutura química da caspofungina, anidulafungina e micafungina.

FONTE: Adaptado de Diomedi (2004).

O segundo fármaco aprovado para uso clínico, a micafungina (Mycamine[®], Astellas), é uma equinocandina lipopeptídica solúvel em água, derivada da modificação semissintética do lipopeptídeo FR901379 obtido de *Streptomyces* sp. (TOMISHIMA et al., 1999). A farmacocinética da micafungina é similar a das outras equinocandinas, com um baixo volume de distribuição e extensa ligação a proteínas plasmáticas. O fármaco é capaz de alcançar e manter concentrações plasmáticas potencialmente terapêuticas que excedem as CIMs de fungos oportunistas susceptíveis (GROLL et al., 2001). Além dessas concentrações elevadas se manterem por até 18 h, uma concentração-dependente pós-antifúngico de até 12 h foi observada para a micafungina, sugerindo que regimes de tratamento uma vez ao dia são suficientes (GROLL et al., 2001). Estudos em coelhos e ratos demonstraram que a micafungina apresenta boa distribuição em tecidos que são locais frequentes de infecções micóticas invasivas, incluindo fígado, rins e pulmões (GROLL et al., 2001; NIWA et al., 2004).

A micafungina não causa interações clínicas significativas com outros fármacos coadministrados, o que mostra que a mesma pouco ou não inibe a atividade da enzima citocromo P450 (NIWA; SHIRAGA; TAKAGI, 2005). A micafungina é metabolizada por múltiplas enzimas, incluindo arilsulfatase, catecol-O-metiltransferase e diferentes tipos de citocromo P450 (KEIRNS et al., 2007). A degradação é lenta, o que aumenta a meia-vida do fármaco, originando dois metabólitos com atividade antifúngica, os quais são excretados pela bile (DENNING, 2003).

Estudos *in vitro* demonstraram que a micafungina tem potente atividade contra *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (MATSUMOTO et al., 2000; TAWARA et al., 2000). Essa atividade também foi demonstrada em modelos animais transientemente imunocomprometidos ou neutropênicos com candidose ou aspergilose (IKEDA et al., 2000). Em um modelo neutropênico de candidose disseminada, coelhos recebendo micafungina nas doses de 0,5, 1 e 2 mg/kg tiveram uma redução significativa na quantidade de leveduras de *C. albicans* no tecido cerebral quando comparados ao controle (PETRAITIS et al., 2002). Em camundongos infectados com *A. fumigatus*, Takazono et al. (2009) observaram que a combinação de 1 mg/kg/dia de micafungina, aplicada intraperitonealmente, e anfotericina B lipossomal aerolizada (8 ml contendo 1,2 mg/ml), apresentou resultados superiores quando comparados com a monoterapia ou ao grupo controle. Em um estudo farmacocinético em camundongos persistentemente neutropênicos com candidose sistêmica, através da análise da razão entre a área sob a curva de concentração e da CIM, foi observado que o tratamento intraperitoneal com uma dose única de micafungina (equivalente a sete dias de tratamento) se mostrou tão eficaz quanto à terapia diária (GUMBO et al., 2007).

Em humanos, a administração intravenosa de micafungina vem sendo amplamente empregada na profilaxia de pacientes transplantados e no tratamento de pacientes com diferentes formas clínicas de infecções por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (HOPE et al., 2008; MIKULSKA; VISCOLI, 2011; SCOTT, 2012).

1.2.11 Tratamento através de imunoterapia

Em contrapartida à terapia farmacológica, a imunoterapia surgiu como uma alternativa para o tratamento da pitiose equina quando Miller (1981) desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do próprio agente (hifas sonicadas). O índice de eficiência obtido na imunoterapia foi de 53% e 75% quando associado à cirurgia (MILLER, 1981; MILLER; CAMPBELL, 1982).

No Brasil, o teste de eficiência de um imunoterápico para o tratamento da pitiose equina, produzido a partir de culturas de *P. insidiosum*, baseando-se na metodologia anteriormente descrita por Miller (1981), demonstrou índice de cura de 50% a 83,3% entre os grupos tratados (MONTEIRO, 1999). Em coelhos infectados experimentalmente, o índice de cura chegou a 71% (SANTURIO et al., 2003). A inovação deste imunoterápico em relação aos outros protocolos de vacinas descritos por Miller (1981) e Mendoza et al. (1992), está na liofilização do imunoterápico com prazo de validade acima de 1 ano, além do processo de liberação de antígenos ocorrer a partir da massa micelial macerada ou liquidificada. Em um estudo mais atual, realizado no Pantanal mato-grossense, Santos et al. (2013) reportaram uma eficácia de 79,4% da imunoterapia em equídeos, a qual não diferiu estatisticamente dos animais tratados com imunoterapia associada à cirurgia.

Em contrapartida aos resultados obtidos em equinos e bovinos, a imunoterapia em cães e gatos tem sido desapontadora. Somente 33% dos caninos e nenhum dos gatos tratados responderam ao tratamento (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Em humanos, a imunoterapia foi utilizada com sucesso em 1998, em um garoto tailandês com pitiose vascular não responsiva à terapia antifúngica (THITITHANYANONT et al., 1998). O paciente recebeu duas doses em um intervalo de duas semanas, sendo totalmente curado após um ano. A imunoterapia tem sido utilizada como último recurso nesse tipo de paciente. Wanachiwanawin et al. (2004) reportaram quatro casos de pacientes que responderam bem ao imunoterápico, dois responderam moderadamente e dois não apresentaram resposta. Krajaejun *et al.* (2006b), ao tratarem 12 pacientes com pitiose vascular com imunoterapia, obtiveram cura em cinco (41,6%), comprovando a eficácia do imunoterápico no tratamento da enfermidade em humanos. Estima-se que a porcentagem de cura em humanos seja de aproximadamente 55%, sendo que a mortalidade aumenta quando tratados após

dois meses do início da doença (WANACHIWANAWIN et al., 2004; GAASTRA et al., 2010). A diminuição da eficácia do imunoterápico com a cronicidade da doença também tem sido observado em animais (MONTEIRO, 1999; SANTOS, 2012).

Uma explicação plausível para o mecanismo de ação da imunoterapia contra *P. insidiosum* é a mudança na resposta imune do hospedeiro. A doença em humanos se caracteriza por aumento na produção de IL-4 e 5, IgE e presença de grande quantidade mastócitos e eosinófilos (THITITHANYANONT et al., 1998). Esse quadro é consistente com uma resposta do tipo Th2 e sugere que o patógeno desenvolveu uma estratégia evolucionária para apresentar antígenos ao sistema imune de forma a desencadear tal resposta (GAASTRA et al., 2010). Em contraste, em pacientes curados pela imunoterapia foram observados níveis altos de IL-2 e IFN- γ , que induzem uma resposta mononuclear, típica da apresentação Th1 (THITITHANYANONT et al., 1998; MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003; WANANACHIWANAWIN et al., 2004).

Corroboram com esses dados o estudo de Bach et al. (2013), que demonstraram que a concentração extracelular de ATP no soro de coelhos com pitiose é baixo, enquanto que os níveis de adenosina são elevados. Consequentemente, esse quadro pode estimular uma resposta imune do tipo Th2. No entanto, os autores observaram que, após oito doses de imunoterapia, houve um aumento significativo na atividade da ecto-ADA em linfócitos, diminuindo os níveis de adenosina extracelular e favorecendo a mudança para resposta Th1, com liberação de citocinas pró-inflamatórias que atuam de forma a diminuir as lesões (Figura 2).

Analisando-se os últimos relatos de tratamentos de animais ou humanos com pitiose, nota-se que dois fatores emergem como os mais importantes para o advento da cura. Primeiro, um diagnóstico definitivo rápido, que hoje passa a ser possível devido ao número crescente de profissionais cientes da doença e da diversidade de opções de diagnóstico, incluindo técnicas microbiológicas, sorológicas e moleculares (GAASTRA et al., 2010; CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013; MENDOZA; VILELA, 2013; THORNTON; WILLS, 2013; TONDOLO et al., 2013). Confirmado o diagnóstico, o tratamento deve agregar quimioterapia, destacando-se a associação de dois fármacos – itraconazol e terbinafina, imunoterapia com antígenos obtidos a partir de culturas de *P. insidiosum* e, se possível, remoção cirúrgica da área afetada (HUMMEL et al., 2011; SUDJARITRUK; SIRISANTHANA, 2011; THIEMAN et al.,

2011; PEREIRA et al., 2013).

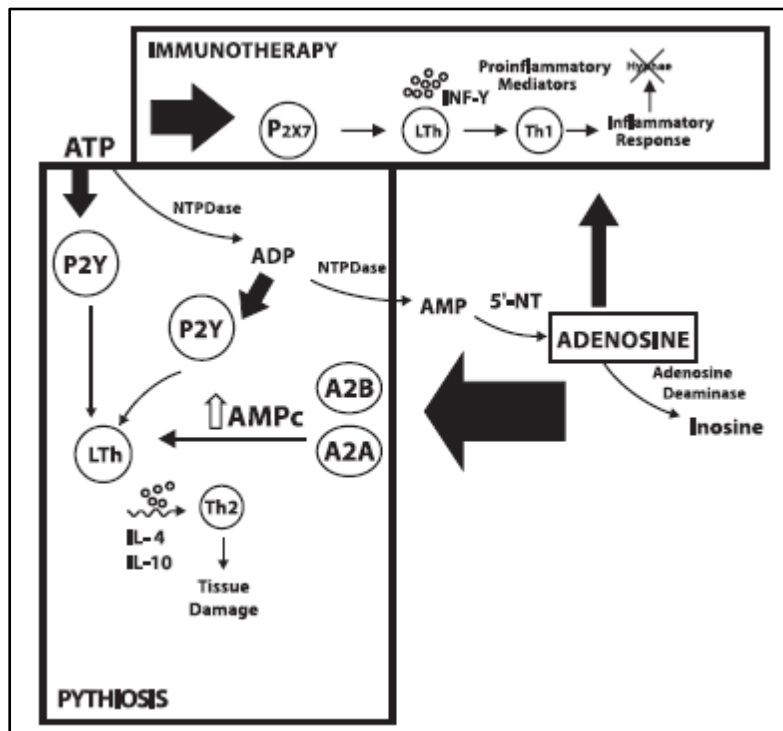


Figura 2 – Efeitos das concentrações extracelulares de ATP e adenosina na resposta imune durante a infecção natural e imunoterapia.

Fonte: Bach et al. (2013).

1.3 O íon ferro

O ferro é um metal de transição, de número atômico 26 (26 prótons e 26 elétrons) e massa atômica 56 u. À temperatura ambiente, encontra-se no estado sólido, sendo o segundo metal mais abundante e o quarto elemento mais comum na crosta terrestre. Apesar desta grande abundância, a maioria do ferro presente na natureza existe na forma férrica (Fe^{3+}), que é amplamente indisponível para a maioria dos sistemas biológicos. Isto se deve a sua insolubilidade na água, exceto quando em solução ácida (ALENCAR et al., 2002).

O ferro é um dos metais amplamente utilizados pelos organismos vivos, participando de processos bioquímico-metabólicos vitais, como síntese de DNA, RNA, proteínas, transporte de elétrons, respiração, proliferação celular e regulação

da expressão gênica (MACHADO; IZUMI; FREITAS, 2005; OZMENT; TURI, 2009; NEVITT, 2011). Em alguns aspectos, o ferro pode ser considerado como um oligoelemento, necessário em quantidades relativamente pequenas como cofator de muitas enzimas. Entretanto, sua presença em quantidades muito maiores em uma proteína, a hemoglobina, faz com que as necessidades do organismo sejam mais difíceis de corrigir do que as de outros oligoelementos metálicos, sendo mais comum seu desequilíbrio (MACHADO et al., 2010).

Para evitar o potencial tóxico e atender às necessidades biológicas essenciais, os níveis de ferro no organismo devem ser rigorosamente controlados, pois tanto a deficiência quanto o excesso alteram o equilíbrio bioquímico-fisiológico e possuem alta prevalência e relevância clínica (ANDREWS, 1999; EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001; WESSLING-RESNICK, 2010).

1.3.1 Absorção do ferro

A maioria do ferro presente na natureza existe na forma Fe^{3+} que, para ser absorvida pelos enterócitos, situados principalmente no intestino delgado proximal, precisa ser reduzida à forma ferrosa (Fe^{2+}), através da ação da enzima citocromo-b duodeno ferro redutase, ou estar complexada ao heme, como no caso das carnes vermelhas, ou a outros quelantes (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). O Fe^{2+} penetra pela superfície apical dos enterócitos e é novamente oxidado para Fe^{3+} pela hefaestina, um homólogo da ceruloplasmina (ANDREWS, 1999; OZMENT; TURI, 2009), para ser transportado pela transferrina na corrente circulatória. Essa capacidade de doar e receber elétrons é crítica para a atividade e também um fator estrutural determinante de um grande número de proteínas, tais como a hemoglobina e mioglobina, e enzimas, cujas funções vão desde a respiração e replicação de DNA até o transporte de oxigênio e ataque redox mediado aos patógenos (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001; NEVITT, 2011).

Na forma heme, o ferro é absorvido rapidamente, independente da composição da dieta, enquanto que o ferro não heme é altamente indisponível e sua absorção é afetada pela dieta (MACHADO et al., 2010). Uma vez que o ferro absorvido é avidamente retido pelo organismo e a capacidade de excreção é

limitada, o controle da absorção intestinal é o principal meio de regulação dos estoques (MACHADO; IZUMI; FREITAS, 2005). O conteúdo de ferro corporal também influencia a sua absorção intestinal, que aumenta com a perda de ferro e diminui quando há grandes estoques no organismo. Em condições fisiológicas, o equivalente a menos de 0,1% do ferro corporal total ou 3% do ferro plasmático é absorvido pelo trato intestinal (cerca de 1 mg/dia), enquanto que em pacientes com eritropoiese defeituosa, a absorção deste micromineral pode chegar a 4 mg/dia, um mecanismo compensatório para permitir a produção acelerada de eritrócitos (KONTOGHIORGHES et al., 2000; OZMENT; TURI, 2009).

A regulação da absorção intestinal de ferro exerce um papel crucial para satisfazer as necessidades da eritropoiese. Tanto os humanos quanto os animais não possuem mecanismos ativos de excreção de ferro, ocorrendo perdas mínimas diárias nas fezes (1 a 2 mg em humanos adultos), através da descamação dos enterócitos e do ferro biliar não absorvido (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001). Essa perda representa menos de 0,1% dos 3-4 g do total de ferro no organismo (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001; GANZ; NEMETH, 2011). Nos equinos, além dessa via, concentrações muito baixas são perdidas pela descamação cutânea e excreção urinária (MACHADO et al., 2010).

1.3.2 Metabolismo do ferro

Um humano adulto normalmente tem entre 35 e 45 mg de ferro por quilograma de peso corporal (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001). As proporções mais importantes da totalidade do ferro corporal encontram-se, em valores aproximados, na hemoglobina (60-70%), na mioglobina (3%), armazenado sob a forma de ferritina e hemossiderina (26%) e em várias enzimas (<1%) (ALENCAR et al., 2002). Essa combinação do ferro a diversas proteínas constitui um importante mecanismo de defesa orgânica, visto que o ferro livre é capaz de catalisar a formação de espécies reativas do oxigênio através da reação de Fenton, podendo causar danos nas membranas celulares e no DNA (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004; NEVITT, 2011).

Quando os eritrócitos são liberados da medula óssea para o sistema circulatório, normalmente circulam em média por 160 dias nos bovinos, 140 a 150 dias nos equinos, 120 dias nos humanos e caninos, 66 a 79 nos felinos e 62 dias em suínos e coelhos (FIGHERA, 2001). Estima-se que em humanos aproximadamente 2×10^{11} eritrócitos são renovados diariamente, requerendo uma quantidade de ferro além da ingerida pela alimentação (OGAWA, 1993). Para suprir essa demanda, em circunstâncias normais, aproximadamente 85% do ferro circulante (20-25 mg) é reciclado pelo sistema monócito-macrofágico através da destruição das hemácias senescentes (OZMENT; TURI, 2009; GANZ; NEMETH, 2011). A hemoglobina é fagocitada e o ferro é conduzido pela transferrina até a medula óssea para a produção de novos eritrócitos, ou ao fígado e outros tecidos para armazenamento sob a forma de ferritina (ANDREWS, 1999). Assim, aproximadamente 1 g de ferro é armazenado nos hepatócitos e macrófagos do fígado (células de Kupffer) e baço (CAZA; KRONSTAD, 2013).

A transferrina, proteína sintetizada nos hepatócitos e macrófagos, é responsável pelo transporte do ferro no plasma e nos líquidos extracelulares (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001). A transferrina tem afinidade por Fe^{3+} , dependendo do pH, sendo que o ferro é liberado em pH abaixo de 6,5 (MACHADO et al., 2005). Entre 70% e 90% do ferro ligado à transferrina plasmática (2-3 mg) é destinado à eritropoiese (GANZ; NEMETH, 2011; NEVITT, 2011). Além disso, a transferrina promove a entrada do ferro no interior das células através de receptores específicos de transferrina (NEVES; WILSON; RODRIGUES, 2009; NEVITT, 2011)

O ferro é estocado como ferritina e hemossiderina, com altas concentrações na medula óssea, nos hepatócitos e nos macrófagos do sistema monócito-macrofágico, principalmente no baço e fígado (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001). A ferritina representa aproximadamente 30% das reservas corporais de ferro, e sua concentração intracelular pode aumentar com a aquisição de ferro exógeno e diminuir na hipoferremia ou pela ação de fármacos quelantes de ferro (ALMEIDA et al., 2008). Na sobrecarga de ferro, os hepatócitos têm capacidade, através dos lisossomos, de degradar ferritina em hemossiderina. A ferritina garante uma reserva solúvel e difusa, constituindo um estoque mais prontamente disponível, de importância crucial para suprir ferro para a eritropoiese acelerada após uma perda sanguínea substancial (ANDREWS, 1999; EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001). Já

a hemossiderina apresenta maior teor de ferro, porém na forma de agregados insolúveis de baixa biodisponibilidade (SMITH, 1997).

Desequilíbrios do metabolismo do ferro podem estar relacionados à deficiência ou sobrecarga, ambas altamente prejudiciais ao organismo. Nos equinos, a sobrecarga de ferro é mais frequente que a deficiência (MACHADO et al., 2010), a qual é considerada rara, ocorrendo principalmente em potros, pela baixa quantidade de ferro no leite (HARVEY et al., 1987). O alto teor de ferro nas forragens e grãos, aliado à capacidade desses animais de conservar o ferro, são suficientes para manter as necessidades de ferro. Na região do Pantanal brasileiro, analisando estudos sobre a composição micromineral das gramíneas nativas e do solo, concluiu-se que não se deve incluir ferro nos suplementos minerais para equinos a pasto, visto que o metal está presente em quantidade excessiva nessas forragens (SANTOS, 1997). De modo geral, as forragens contêm de 50 a 400 mg de ferro kg^{-1} de matéria seca, e os grãos de cereais de 30 a 90 mg kg^{-1} ; já a necessidade de ferro para equinos adultos em manutenção é de 40 mg de ferro kg^{-1} de matéria seca (MACHADO et al., 2010).

1.3.3 Avaliação laboratorial do metabolismo do ferro

Indicadores eritrocitários, como o hematócrito e a concentração de hemoglobina, são comumente utilizados para avaliar se o “status” de ferro está adequado, apesar de não constituírem indicadores confiáveis para esse fim. Anemia não é sinônimo de deficiência de ferro, ocorrendo diminuição da síntese de hemoglobina apenas nas deficiências severas (SMITH et al., 1986). Em teoria, a carência de ferro ocorre no organismo de forma gradual e progressiva (Figura 3), considerando-se três estágios até que a anemia se manifeste: depleção de ferro, no qual não se observa alterações significativas momentâneas; deficiência de ferro, marcado por alterações bioquímicas que refletem a insuficiência desse metal, além da observação de uma eritropoiese ferro-deficiente; e anemia ferropriva, estágio caracterizado pela diminuição dos níveis de hemoglobina (PAIVA; RONDÓ; GUERRA-SHINOHARA, 2000).

As alterações no volume e na cor das hemácias proporcionam uma informação útil em relação ao estado nutricional de ferro. As variáveis eritrocitárias estão geralmente normais durante os estágios iniciais da deficiência de ferro, enquanto que a deficiência crônica é caracterizada por anemia microcítica hipocrômica (MACHADO et al., 2010). Os índices hematimétricos comumente utilizados são: volume corpuscular médio (VCM), que avalia o tamanho médio dos eritrócitos; variação da amplitude de distribuição de eritrócitos (RDW), que avalia a variabilidade no volume dos eritrócitos, estando elevado na anemia ferropriva (GROTTO, 2010); hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), que avaliam a concentração de hemoglobina no eritrócito (PAIVA; RONDÓ; GUERRA-SHINOHARA, 2000).

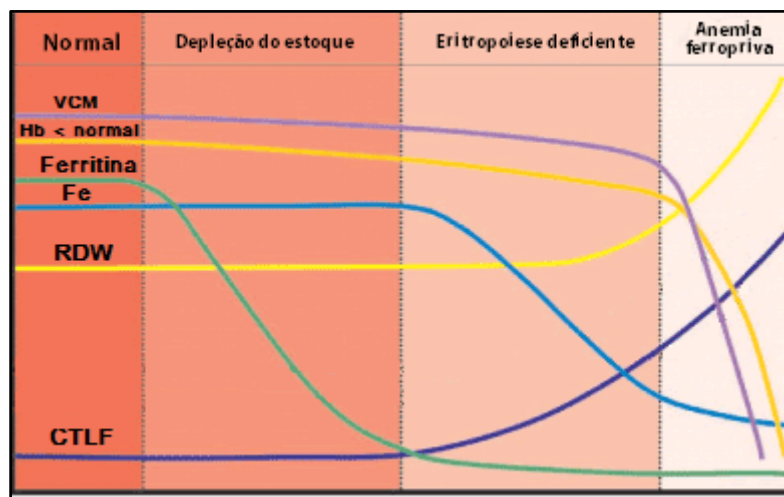


Figura 3 – Evolução das variáveis eritrocitárias no decorrer da evolução da depleção de ferro.

Fonte: Adaptado de Grotto (2010).

VCM, volume corpuscular médio; Hb, hemoglobina; Fe, ferro sérico, RDW, amplitude de distribuição eritroide; CTF, capacidade total de ligação do ferro.

O compartimento de transporte pode ser avaliado pela concentração sérica de ferro e por índices que avaliam indiretamente a concentração de transferrina. No entanto, a concentração de ferro sérico não reflete os estoques do organismo, pois é um parâmetro muito instável, alterando-se com variações fisiológicas, ciclo circadiano, contaminação durante a coleta, etc. (GROTTO, 2010). No entanto,

quando as reservas de ferro estão exauridas, qualquer declínio adicional no ferro corporal é acompanhado por uma redução na concentração do ferro sérico (PAIVA; RONDÓ; GUERRA-SHINOHARA, 2000). Quando a transferrina é saturada com uma concentração conhecida de ferro, a quantidade total desse mineral que se liga a ela é chamada de capacidade total de ligação do ferro (CTLF), ou seja, a CTLF é a soma de todos os espaços de ligação de ferro disponíveis na transferrina. O índice de saturação da transferrina refere-se à porcentagem que está na forma ligada ao ferro, obtida pela divisão da concentração de ferro pela CTLF (SMITH, 1997; MACHADO et al., 2010). Em circunstâncias normais, apenas um terço dos espaços de ligação do ferro à transferrina estão ocupados nos humanos.

Outro bom índice para avaliação dos estoques de ferro no organismo é a dosagem da ferritina sérica, que possui forte correlação com o conteúdo de ferro hepático, esplênico e medular (KONTOGHIORGHES et al., 2000; ORINO; WATANABE, 2008). A diminuição da ferritina é um indicativo confiável de deficiência de ferro, porém resultados normais e elevados devem ser avaliados com cautela. Por ser uma proteína de fase aguda, a ferritina pode estar aumentada em resposta a infecções, hepatopatias, neoplasias e ao exercício (ANDREWS, 1999; MACHADO et al., 2010).

O ferro tecidual pode ser avaliado por biópsia ou punção aspirativa de fígado ou medula óssea. Sendo o fígado o principal órgão de armazenamento de ferro (BARRY, 1974), a coloração dos depósitos de ferro hepático (hemossiderina), através da técnica com azul da Prússia, é um dos métodos mais adequados de avaliação dos estoques de ferro no organismo. Esse método é capaz de identificar o nível bem como o padrão dos depósitos de ferro nos hepatócitos e nas células de Kupffer (KONTOGHIORGHES et al., 2000; OZMENT; TURI, 2009).

1.3.4 Sequestro de ferro e anemia da inflamação

O ferro tem um papel de destaque no contexto das doenças infecciosas, particularmente nos mamíferos. Se de um lado a aquisição de ferro é um fator determinante para a infecção e persistência do micro-organismo no hospedeiro, de outro o hospedeiro manipula ativamente os níveis de ferro locais e sistêmicos como

um mecanismo microbiostático para conter a proliferação microbiana (JURADO, 1997; NEVITT, 2011). A compartimentalização eficaz do ferro para longe dos micro-organismos, armazenando-o no interior das células ou fortemente ligado a proteínas e ligantes, permite ao hospedeiro satisfazer suas necessidades de ferro bem como articula uma resposta microbicida através de mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio utilizando ferro e cobre (NEVITT, 2011).

A concentração de ferro sérica diminui notavelmente em humanos e cães durante os primeiros dias de infecção sistêmica ou inflamação. Jurado (1997) considera que a função da anemia da infecção é privar os micro-organismos de utilizarem ferro. Infecções ou inflamações prolongadas geralmente levam ao desenvolvimento de anemia normocítica normocrômica leve a moderada, caracterizada por produção eritrocitária inadequada na presença de baixo ferro sérico e CTLF diminuída (WESSLING-RESNICK, 2010). Apesar disso, os estoques de ferro estão preservados ou até mesmo aumentados nos principais órgãos armazenadores (GANZ; NEMETH, 2009). É importante lembrar que a transferrina pode se comportar como uma proteína de fase aguda negativa ou positiva, ou seja, seus níveis podem estar diminuídos ou aumentados em processos inflamatórios ou infecciosos (NEVES; WILSON; RODRIGUES, 2009).

Durante a resposta inflamatória, há um decréscimo na absorção de ferro que se correlaciona com um aumento nos níveis da hepcidina, um hormônio peptídico cuja função é regular a homeostasia do ferro (WESSLING-RESNICK, 2010; GANZ; NEMETH, 2011). O alvo da hepcidina nos mamíferos é a proteína ferroportina, expressada primariamente nos enterócitos, hepatócitos, macrófagos e células placentárias (WESSLING-RESNICK, 2010). A ligação da hepcidina à ferroportina desencadeia a internalização desse transportador e sua degradação lisossomal, prevenindo assim a liberação do ferro da dieta armazenado nos enterócitos e impedindo a mobilização do ferro estocado nos hepatócitos e macrófagos, levando, conseqüentemente, à hipoferremia e ao comprometimento da eritropoiese (GANZ; NEMETH, 2009; NEVITT, 2011). Dessa forma, a deficiência de ferro que se desenvolve durante a anemia da inflamação é resultado da absorção limitada e retenção do ferro no sistema monócito-macrofágico (WESSLING-RESNICK, 2010).

Embora geralmente saturada, uma molécula de ferritina pode armazenar até 4500 átomos de ferro. Em pacientes com deficiência de ferro, os níveis de ferritina sérica estão conseqüentemente diminuídos (GANZ; NEMETH, 2009), refletindo os

estoques corporais de ferro. Contudo, durante o processo inflamatório sua síntese aumenta sob influência da IL-1 e do TNF- α (JURADO, 1997). Citocinas também podem induzir indiretamente a síntese de ferritina através do aumento da captação de ferro pelos hepatócitos (JURADO, 1997; NEVES; WILSON; RODRIGUES, 2009). Como o aumento da síntese de ferritina precede a hipoferremia, sugere-se que o aumento da ligação do ferro à ferritina seja o mecanismo responsável pela menor saída de ferro do sistema monócito-macrofágico, já que a absorção diminuída de ferro não tem grande relação com a hipoferremia observada nos pacientes com anemia da inflamação. Além disso, a ativação fagocitária via receptores de reconhecimento padrão e da citocina IFN- γ resulta em um decréscimo na expressão de receptores de transferrina, limitando a habilidade das células em adquirir o ferro ligado à transferrina e conseqüentemente, a quantidade de ferro intracelular disponível aos patógenos (JOHNSON; WESSLING-RESNICK, 2012).

1.3.5 Obtenção de ferro pelos fungos

O requerimento essencial de ferro e sua baixa disponibilidade no ambiente se refletem claramente nos múltiplos mecanismos empregados pelos micro-organismos para obter esse nutriente. O sequestro de ferro pelo organismo é mediado por proteínas como a ovoalbumina, transferrina, lactoferrina e ferritina, resultando em concentrações de ferro disponível na ordem de 10^{-15} M (JURADO, 1997), enquanto que concentrações de ferro entre 10^{-6} e 10^{-7} são necessárias para os mais variados processos metabólicos microbianos (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004).

Em compensação, os patógenos podem driblar esta imunidade nutricional através de quatro formas eficientes de obtenção de ferro: (1) aquisição de ferro heme e de hemoproteínas; (2) obtenção do ferro da transferrina, lactoferrina e ferritina; (3) aquisição de ferro através de sideróforos; e (4) aquisição de ferro reduzido (Fe^{2+}) (CAZA; KRONSTAD, 2013).

A habilidade de utilizar o ferro-heme e a hemoglobina como fonte de ferro por *C. albicans* foi primeiramente descrita por Moors et al. (1992), o quais demonstraram que a levedura se liga aos eritrócitos através de moléculas tipo receptores de complemento. Mais tarde foi reportado que *C. albicans* causa lise dos eritrócitos

através da secreção de uma mananoproteína, e a ligação com a hemoglobina é mediada por receptores específicos expostos na superfície do fungo (MANNIS; MOSSER; BUCKLEY, 1994; CAZA; KRONSTAD, 2013). Outra estratégia desse fungo é a obtenção de ferro diretamente da hemoglobina livre, haptoglobina e hemopexina (CRICHTON, 2001).

Já a levedura *Cryptococcus neoformans* é capaz de crescer na presença de hemoglobina e heme como fontes única de ferro, pois secreta uma proteinase serina que degrada a hemoglobina e outros substratos (JUNG; KRONSTAD, 2008). Outros fungos patogênicos também são capazes de utilizar o ferro-heme e as hemoproteínas, como o fungo dimórfico *H. capsulatum*, que utiliza o heme como fonte única de ferro através de um receptor putativo de superfície (FOSTER, 2002).

No plasma, a concentração de ferro livre é de $\sim 10^{-24}$, principalmente pelo fato da transferrina estar parcialmente saturada com ferro (30-40%), limitando a disponibilidade de ferro livre (CAZA; KRONSTAD, 2013). Dessa forma, tanto a transferrina quanto a lactoferrina têm efeito inibitório no crescimento dos fungos *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* e *C. neoformans*. Contudo, esses fungos podem crescer quando as proteínas estão totalmente saturadas com ferro (KNIGHT et al., 2005). O método de obtenção é pelo contato direto com os receptores de superfície das proteínas ou através de um sistema redutivo de alta afinidade que inclui a ferro permease Ftr1 e a ferro redutase Fre10 em *C. albicans*, e a ferro permease Cft1 em *Cryptococcus* spp. (CRICHTON, 2001; CAZA; KRONSTAD, 2013). Igualmente, a obtenção de ferro a partir da ferritina tem sido bem caracterizada para *C. albicans*, que utiliza a adesina Als3 como receptor de ferritina (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009). Estudos *in vitro* também demonstraram que a apotransferrina (transferrina sem ferro) é letal para *H. capsulatum* (SUTCLIFFE; SAVAGE; ALFORD, 1980).

Embora alguns organismos pertencentes à microbiota normal dos mamíferos consigam obter o ferro diretamente a partir da quebra enzimática das proteínas plasmáticas, a maior parte dos mesmos utiliza mecanismos de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} ou quelantes orgânicos de baixo peso molecular envolvidos na solubilização e sequestro de Fe^{3+} , conhecidos como sideróforos (NEVITT, 2011). Mecanismos para a redução do ferro da forma férrica para a forma ferrosa estão presentes tanto em bactérias quanto em fungos (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004; SKAAR, 2010; NEVITT, 2011). A forma ferrosa pode existir em ambientes ácidos e em condições de anóxia, bem como pode ser gerada a partir de atividades de redutases celulares

(CAZA; KRONSTAD, 2013). *C. albicans*, por não produzir sideróforos, obtém ferro através da redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} , pelo qual a transferrina tem pouca afinidade. Duas redutases foram identificadas nesse fungo, embora a sequência genômica parece apontar que esse fungo possui ainda outras redutases (HAMMACOTT; WILLIAMS; CASHMORE, 2000; KNIGHT et al., 2002).

Redutases férricas também estão presentes em fungos como *H. capsulatum*, *A. fumigatus* e *C. neoformans* (NEVITT, 2011). Saikia et al. (2013) reportaram que o genoma de *C. neoformans* codifica oito redutases férricas. Além disso, sabe-se que *C. neoformans* em condições ferroprivas expressa uma redutase férrica que disponibiliza Fe^{2+} para um sistema de transporte transmembrana tanto de baixa quanto de alta afinidade (CRICHTON, 2001). Estudos com *A. fumigatus* revelaram que o mesmo possui 15 redutases que reduzem o ferro para a forma ferrosa (BLATZER; BINDER; HAAS, 2011), a qual é incorporada por ferro permeases idênticas às presentes em *C. albicans* (SCHRETTL et al., 2004). Contudo, esse sistema de redução de ferro não tem importância na virulência de *A. fumigatus*, que se beneficia principalmente da produção de sideróforos (SCHRETTL et al., 2004).

Sideróforos, do grego “carreadores de ferro”, são ligantes ferro-específicos de baixo peso molecular cuja função é procurar e obter ferro para os micro-organismos (JURADO, 1997; SCHRETTL; HAAS, 2011). Como exemplo de fungos produtores de sideróforos, temos *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Fusarium graminearum* e *H. capsulatum*, apesar dos mesmos terem mecanismos auxiliares secundários de obtenção de ferro (NEVITT, 2011; HAAS, 2012). Por exemplo, o fungo *H. capsulatum*, além do sistema de redutase férrico de alta afinidade, secreta cinco sideróforos hidroxamatos diferentes (HOWARD, 1999). Já Hissen et al. (2004) demonstraram que a sobrevivência de *A. fumigatus* no soro humano *in vitro* envolve a remoção de ferro ligado à transferrina, sendo a degradação proteolítica da transferrina um mecanismo secundário na aquisição desse metal. Posteriormente, descobriu-se que *A. fumigatus* secreta dois sideróforos diferentes, fusarinina C e triacetilfusarinina C (SCHRETTL; HAAS, 2011; CAZA; KRONSTAD, 2013). Os dois primeiros são responsivos a um ambiente de privação de ferro e funcionam ligando-se ao ferro extracelular com subsequente transporte para o interior da célula através de transportadores de sideróforos (SCHRETTL; HAAS, 2011). De modo interessante, outro sideróforo, a ferricrocina, é produzida intracelularmente, sendo coordenada de acordo com a morfologia do fungo, *i.e.*, é produzida durante a fase

de crescimento das hifas, enquanto que a hidroxiferricrocina é produzida dentro dos conídios (SCHRETTL et al., 2007). Acredita-se que os fungos, além de armazenar ferro no sistema vacuolar, também o façam utilizando os sideróforos intracelulares (HOWARD, 1999; SCHRETTL et al., 2007). À exceção dos zigomicetos (HOWARD, 1999), tem sido extremamente difícil achar evidências da existência de proteínas armazenadoras de ferro, como a ferritina, encontrada em bactéria, plantas, animais e quase todos os outros organismos vivos (CRICHTON, 2001; SCHRETTL; HAAS, 2011). Dentro do vacúolo, o ferro fica armazenado na forma reduzida, servindo de substrato para a ferroquelatase, que é a enzima responsável pela inserção de ferro no heme (LABBE-BOIS; CAMADRO, 1994)

Embora os fungos *C. neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans* não produzam seus próprios sideróforos, eles possuem transportadores específicos que são utilizados na obtenção de ferro a partir de sideróforos produzidos por outros organismos (HOWARD, 1999; CRICHTON, 2001; HEYMANN et al., 2002; TANGEN et al., 2007). Contudo, esse mecanismo não parece ter relação com a virulência de *C. neoformans* e *C. albicans* (SAIKIA et al., 2013). Além disso, no caso específico de *C. albicans*, ainda não está claro o papel do sistema de redutases, da aquisição de ferro a partir do heme ou dos xenosideróforos durante as diferentes fases da infecção. Um estudo recente demonstrou que esse fungo pode ajustar as estratégias de aquisição de ferro em resposta às mudanças do metabolismo de ferro do hospedeiro (POTRYKUS et al., 2013).

De acordo com Howard (1999), a passagem do ferro obtido pelos sideróforos através da membrana citoplasmática fúngica pode ocorrer através de quatro mecanismos distintos: 1) O complexo sideróforo-ferro pode entrar intacto, e o ferro é liberado por uma redutase ou pela ligação com outro sideróforo de armazenamento, sendo o de transporte liberado para capturar uma nova molécula do metal; 2) O ferro é aprisionado por um quelante interno sem a entrada do sideróforo na célula; 3) as ligações éster do sideróforo são divididas por um mecanismo de redutase-esterase, o grupo funcional da molécula é excretado e o ferro é reduzido e armazenado; 4) outro mecanismo redutivo, no qual o sideróforo “desiste” do Fe^{3+} , o qual é reduzido a Fe^{2+} e transportado. Esse mecanismo é comumente observado nos fungos que não expressam seus próprios sideróforos.

1.3.6 Desordens metabólicas do ferro

Além dos mecanismos de obtenção de ferro citados anteriormente, algumas situações patofisiológicas do hospedeiro facilitam a disponibilização e consequente obtenção de ferro pelos micro-organismos. Estudos epidemiológicos na África indicam que a sobrecarga de ferro nutricional, pelo consumo de grãos cultivados em solos vulcânicos ou pela ingestão de cerveja fermentada em recipientes de ferro a partir de grãos locais, é um fator de risco para aumento da morbidade e mortalidade da tuberculose ativa (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). Em contrapartida, a anemia por deficiência de ferro é comum em áreas de transmissão de malária e está associada à proteção contra essa enfermidade (NYAKERIGA et al., 2004).

Pacientes com cetoacidose diabética têm predisposição a infecções por fungos do gênero *Mucor*, *Absidia*, e *Rhizopus*, que são favorecidas em parte pelo aumento do ferro livre na circulação (SPELLBERG et al., 2012). Esse mecanismo patofisiológico é desencadeado pela menor afinidade da transferrina por ferro em função da diminuição do pH sanguíneo (JURADO, 1997). Já Lambert e Hunter (1990) demonstraram o papel da transferrina insaturada como fator prognóstico de sobrevivência nas infecções pneumocócicas.

Estudos demonstram que a aspergilose invasiva está associada à sobrecarga de ferro em pacientes com doenças hematológicas (ALTES et al., 2004). Kontoyiannis et al. (2007) reportaram que o aumento de ferro na medula óssea é um fator de risco independente para o desenvolvimento de aspergilose pulmonar invasiva em pacientes com desordem hematológicas ou transplantados. Similarmente, pacientes com sobrecarga de ferro causada por talassemia ou hemocromatose cursam frequentemente com diminuição no número de linfócitos T CD⁸⁺, respondendo positivamente ao tratamento com quelantes de ferro como a desferroxamina. Pacientes com beta talassemia estão propensos a infecções por diversas espécies de bactérias, protozoários, vírus e fungos como *C. neoformans*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis jirovesi*, bem como pelo oomiceto *P. insidiosum* (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004; KRAJAEJUN et al., 2006b; KONTOGHORGHES et al., 2010).

Diversas hipóteses explicam a associação de sobrecarga de ferro com o desencadeamento das infecções, incluindo o aumento da saturação da transferrina

sérica e da lactoferrina em secreções e em neutrófilos (KONTOGHIORGHES et al., 2010). A lactoferrina é uma proteína presente em secreções de mucosas e leucócitos polimorfonucleares que possui grande afinidade por ferro. Na circulação, a lactoferrina está parcialmente saturada com ferro, o que lhe permite se ligar ao ferro livre nos tecidos (JURADO, 1997; SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). Conseqüentemente, a habilidade da lactoferrina em sequestrar ferro funciona como uma primeira linha de defesa contra a invasão dos micro-organismos. Por sua maior afinidade por ferro em pH baixos, a lactoferrina se liga a mais moléculas de ferro do que a transferrina em locais de inflamação (JURADO, 1997).

Tanto a deficiência como a sobrecarga de ferro parecem afetar a resposta imune do hospedeiro de uma forma similar. A deficiência de ferro diminui a resposta de linfócitos T em diversos modelos experimentais (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). Já ferro em excesso resulta em uma alteração global na produção de mediadores da resposta do tipo humoral, como anticorpos, complemento e citocinas, incluindo um aumento nos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-6 e IL-10, deixando o hospedeiro mais susceptível a infecções. Os efeitos da sobrecarga de ferro na resposta celular se referem à diminuição dos linfócitos tipo Th1 e aumento dos tipo Th2. Células Th1 são importantes porque liberam citocinas pró-inflamatórias tais como o IFN- γ , necessário na ativação macrofagocitária (OZMENT; TURI, 2009; WESSLING-RESNICK, 2010).

Segundo Mencacci et al. (1997), a quantidade de ferro altera profundamente o tipo de resposta imune de camundongos frente ao fungo *C. albicans*. Resposta do tipo Th2 predominou nos camundongos que receberam ferro dextrano, com decréscimo na produção de IFN- γ e aumento dos níveis de IL-4 e IL-10, contribuindo para uma menor atividade antifúngica pelas células fagocitárias. No entanto, os camundongos que foram tratados com um quelante de ferro restabeleceram a habilidade de resistir à infecção, resultado do aparecimento de resposta do tipo Th1 (detecção de IFN- γ e IL-12). Estudos *in vivo* têm demonstrado que uma dieta rica em ferro é capaz de reduzir os níveis de IFN- γ , implicando os efeitos deletérios da sobrecarga de ferro na resposta imune (WESSLING-RESNICK, 2010). É importante salientar que, além da modulação do tipo de resposta imune, o ferro contribui significativamente para o sucesso no desenvolvimento de fungemia de *C. albicans*, que foi o primeiro fungo a se ter conhecimento de possuir a capacidade de utilização do ferro ligado à ferritina (ALMEIDA et al., 2008).

1.3.7 Terapia antimicrobiana com quelantes de ferro

O sequestro de ferro utilizando fármacos quelantes se constitui numa importante estratégia de defesa para mamíferos nas situações em que a sobrecarga de ferro não está presente, especialmente naquelas em que a terapia antimicrobiana não foi eficaz (KONTOGHIORGHES et al., 2010). Incluem-se nesse quadro pacientes não-responsivos à terapia antimicrobiana estabelecida, imunocomprometidos e que desenvolveram resistência aos fármacos disponíveis.

Quelante (do grego, “pinça de caranguejo”) é uma molécula natural ou sintetizada quimicamente que tem alta especificidade e afinidade por um íon metálico, formando um complexo a partir desse. Um quelante ideal, designado para remover um metal em particular de um organismo, deve ser capaz de se ligar, carrear e remover o metal do corpo sem causar qualquer toxicidade (KONTOGHIORGHES et al., 2000). Dentro desse contexto, quelantes de ferro devem em princípio reduzir a sobrecarga de ferro causando um balanço de ferro negativo, o que significa excretar ferro em níveis iguais ou maiores do que o corpo absorve pela alimentação ou em pacientes submetidos a transfusões sanguíneas constantes (KONTOGHIORGHES et al., 2000; CAPPELLINI, 2007).

Fármacos quelantes têm diferentes propriedades físico-químicas, farmacológicas, toxicológicas e funcionais. A remoção do excesso de ferro pode ser realizada através da aplicação diária subcutânea ou intravenosa de mesilato de desferroxamina, do uso oral de deferiprona ou deferasirox ou da combinação de deferiprona e desferroxamina (Figura 4) (KOLNAGOU; KLEANTHOUS; KONTOGHIORGHES, 2010). O alvo dos quelantes é o ferro “quelável” ou ferro livre, geralmente encontrado em compartimentos lábeis nos tecidos, ou como ferro não-ligado à transferrina presente no plasma de pacientes com sobrecarga de ferro, nos quais a transferrina apresenta-se 100% saturada (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001; OZMENT; TURI, 2009). O deferiprone, por exemplo, é capaz de entrar nas células quando em concentrações elevadas, e o complexo com o ferro é rapidamente difundido para fora das células e excretado. O mesmo também é capaz de mobilizar o ferro ligado à transferrina e o depositado nos tecidos (KOLNAGOU; KLEANTHOUS; KONTOGHIORGHES, 2010).

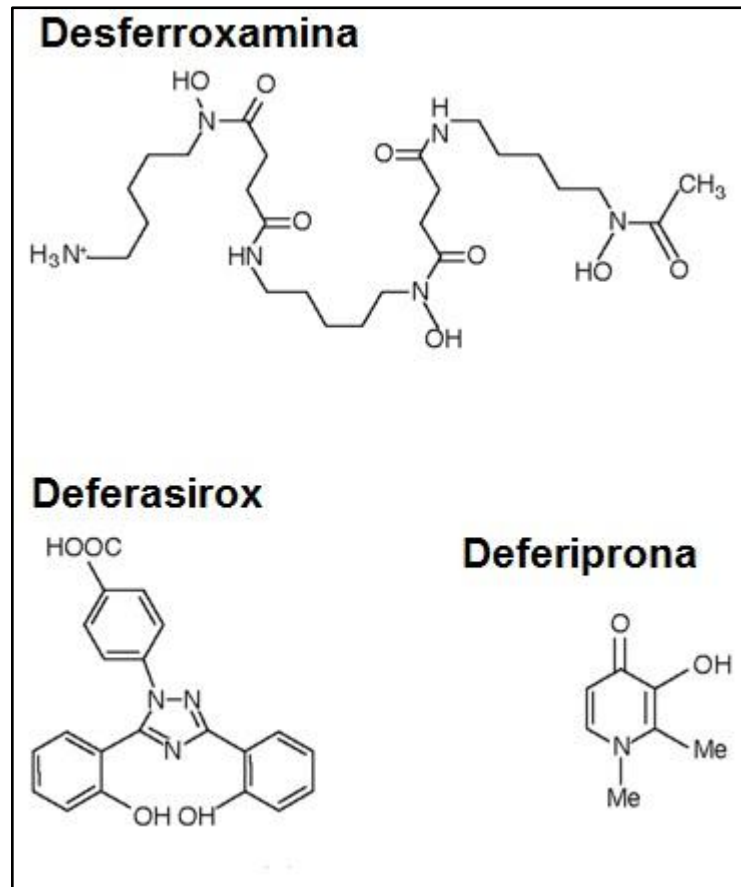


Figura 4 – Estrutura química do mesilato de desferroxamina, da deferiprona e do deferasirox.

Fonte: Adaptado de Molecular Medicine[®].

O deferasirox (ICL670, Exjade[®]; Novartis) é membro de uma nova classe de quelantes de ferro tridentados, a N-substituído bis-hidroxifenil-triazólica. É absorvido após administração oral e possui meia-vida de 8 a 16 h, permitindo uma única administração diária. Como demonstrado em vários estudos com animais, o deferasirox é rapidamente absorvido, podendo eficientemente e seletivamente mobilizar ferro de várias células, tais como hepatócitos e cardiomiócitos, formando um complexo inerte com a molécula de ferro (Figura 5). Esse complexo ou a molécula do fármaco são primariamente glucoronizados, tendo em seguida excreção hepatobiliar e eliminação nas fezes (CAPELLINI et al., 2006; CAPELLINI, 2007).

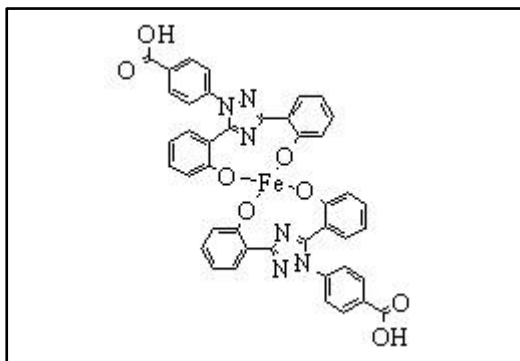


Figura 5 – Ligação do deferasirox com uma molécula de ferro.

Fonte: Cachesyn Inc.

A dose padrão de deferasirox em humanos é de 20-30 mg/kg/dia, mas pode ser menor ou maior dependendo da finalidade do tratamento. Em pacientes submetidos a constantes transfusões sanguíneas, deferasirox na dose de 20 mg/kg/dia não alterou a concentração de ferro no fígado, manteve neutro o balanço de ferro e estabilizou os níveis de ferritina sérica. Na dose de 30 mg/kg/dia, houve decréscimo do ferro hepático e da ferritina sérica, desencadeando um balanço negativo de ferro (CAPELLINI et al., 2006) Os níveis plasmáticos de deferasirox, na dose de 20 mg/kg/dia, mantiveram-se dentro do limiar terapêutico em pacientes com talassemia por um período superior a 24 h (pico máximo de ~60-100 $\mu\text{mol/L}$, níveis médios de ~15-20 $\mu\text{mol/L}$) (CAPELLINI, 2007).

Ibrahim et al. (2007) reportaram que o deferasirox tem excelente atividade antifúngica *in vitro* contra fungos da ordem Mucorales, com CIM_{90} e concentração fungicida mínima (CFM_{90}) de 6,25 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, esses autores reportaram que em ratos com cetoacidose diabética induzida, deferasirox na dose de 10 mg/kg, duas vezes ao dia, foi tão efetivo quanto a anfotericina B lipossomal. Dessa forma, o deferasirox tem sido utilizado, no geral com sucesso, por pacientes com mucormicose (REED et al., 2006; SPELLBERG et al., 2009).

Uma menor atividade antifúngica do deferasirox foi observada frente a isolados de *A. fumigatus*, com CIM e CFM de 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Ao ser administrado na dose de 10 mg/kg/dia em camundongos com aspergilose pulmonar invasiva, o quelante teve um efeito modesto, embora significativo; no entanto, a combinação de deferasirox e anfotericina B lipossomal teve ação sinérgica, aumentando significativamente o tempo de vida dos camundongos e

reduzindo a carga fúngica pulmonar (IBRAHIM et al., 2010). Nesse mesmo princípio, tripla combinação usando anfotericina B lipossomal, micafungina e deferasirox obteve resultados superiores do que os fármacos utilizados sozinhos ou em dupla combinação em camundongos com mucormicose ou aspergilose (IBRAHIM et al., 2011).

Apesar do efeito fungicida *in vitro* contra Mucorales e da eficácia substancial em modelo murino, o deferasirox pode ter impacto nulo ou até mesmo piorar o curso clínico de mucormicose em humanos. Spellberg et al. (2012) conduziram um estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado em pacientes com mucormicose aguda, que foram tratados com placebo ou com a combinação de anfotericina-B lipossomal e deferasirox (20 mg/kg/dia), por 14 dias. Ao final de 90 dias, houve maior mortalidade no grupo tratado com deferasirox, e os autores concluíram, embora relutantemente, que os dados obtidos não suportam o tratamento adjunto inicial com deferasirox na terapia contra mucormicose. É importante salientar que o excesso de mortalidade no grupo tratado foi resultado de falha clínica pela progressão da infecção e aparecimento de outras complicações clínicas, e não por qualquer toxicidade do medicamento.

Os mecanismos pelos quais o deferasirox possa piorar a infecção não são bem compreendidos. Não há relatos de antagonismo com outros fármacos, e o quelante também não age favorecendo o crescimento fúngico *in vitro* ou em camundongos (CAPELLINI, 2007; IBRAHIM et al., 2007). A administração de desferroxamina, por exemplo, resulta na piora de infecções como yersiniose e mucormicose, o que se atribui ao fato do próprio quelante servir como sideróforo ao fungo (ABE et al., 1990; BOELAERT et al., 1993; JURADO, 1997). Em contraste, o deferasirox parece não agir dessa forma, embora a possibilidade do aumento na entrega de ferro ao fungo não possa ser excluída (DONNELLY; LAHAV, 2012).

A noção de que a quelação de ferro possa servir como uma modalidade alternativa de tratamento data de mais de 30 anos. Atualmente, o uso de quelantes nas infecções fúngicas está tão evidente e é tão polêmico que, poucos meses após a publicação do estudo de Spellberg et al. (2012), Donnelly e Lahav (2012), levantaram dúvidas sobre possíveis vieses acerca dos resultados. É de consenso entre a comunidade acadêmica que os resultados favoráveis obtidos *in vitro* e em modelos animais devem ser levados em consideração, pois um número crescente de infecções fúngicas tem surgido anualmente.

1.4 Modelos invertebrados de infecções fúngicas

O modelo murino é um dos modelos experimentais mais utilizados para o estudo das infecções fúngicas, principalmente devido à similaridade dos sistemas imunológicos e fisiológicos com o dos humanos. No entanto, as dificuldades éticas e logísticas com o uso de camundongos diminuem a velocidade do entendimento no campo da micologia, o qual deve progredir de forma rápida para impedir a crescente resistência dos patógenos aos antimicrobianos (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013).

A necessidade emergente de um método mais fácil e rápido para experimentos *in vivo* pode ser endereçada através do uso de modelos invertebrados. Diversos estudos têm demonstrado que muitos aspectos da imunidade inata estão conservados entre mamíferos e insetos (HOFFMANN et al., 1999). Além disso, o baixo custo, a simplicidade, o ciclo reduzido de vida e a ausência de necessidade de aprovação ética tornam esses invertebrados os candidatos ideais para estudos em larga escala (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

Entre os modelos invertebrados mais estudados destacam-se o nematoide *Caenorhabditis elegans*, a larva da traça da cera *Galleria mellonella* e a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*. Estudos de fatores de virulência e susceptibilidade a antifúngicos utilizando *C. elegans* foram realizados para *Candida* spp., *C. neoformans* e *H. capsulatum* (MYLONAKIS et al., 2002; JOHNSON et al., 2009; PUKKILA-WORLEY et al., 2009). Além desses fungos, *G. mellonella* também tem se mostrado como um modelo excelente para o estudo de *A. fumigatus* (FALLON; TROY; KAVANAGH, 2011; LIONAKIS, 2011).

Desde a inovadora descoberta de Lemaitre et al. (1996) de que os receptores Toll exercem um papel essencial na defesa contra fungos patogênicos em *Drosophila*, a mosca-das-frutas tem sido amplamente utilizada em experimentos de patogênese fúngica. O gênero *Drosophila* possui duas formas de resposta a patógenos. A primeira, chamada de resposta sistêmica, consiste na produção massiva de peptídeos ou polipeptídeos antimicrobianos (PAMs) em resposta à invasão de bactérias ou fungos na hemolinfa. Esse mecanismo de defesa divide similaridades com a resposta aguda de infecção em mamíferos. Contudo, enquanto a resposta aguda em mamíferos é induzida por citocinas inflamatórias produzidas

por outras células, nos insetos a resposta sistêmica é ativada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que são ativados diretamente pelas moléculas dos insetos (BRODERICK; WELCHMAN; LEMAITRE, 2009; ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013). A segunda resposta é a local, particularmente imunidade epitelial gastrointestinal, cuja importância está implicada principalmente na infecção natural de *Drosophila* spp. por patógenos.

Duas sinalizações, Toll e Imd, estão descritas na mosca-das-frutas, as quais têm a função de regular os genes codificadores de PAMs. Ambas dividem padrões em comum com os receptores do tipo Toll e com o TNF- α dos mamíferos. A Imd parece ser mais importante contra bactérias Gram-negativas e controla genes codificadores de peptídeos antibacterianos, como a Diptericina. Já a sinalização Toll/Spätzle tem por função combater bactérias Gram-positivas e fungos através da expressão de PAMs com atividade contra fungos, como a Drosomicina (Figura 6). Especificamente, os PRRs reconhecem a invasão fúngica através das β -glucanas e desencadeiam uma reação que leva ao processamento de uma pequena molécula (Spätzle), cuja função é se ligar ao receptor Toll (BRODERICK; WELCHMAN; LEMAITRE, 2009; PARK; LEE, 2012; ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013).

Moscas mutantes deficientes em todos os componentes da cascata Toll são viáveis, mas extremamente sensíveis à infecção por bactérias Gram-positivas e fungos (LEMAITRE et al., 1996), devido a não exibirem expressão apropriada de proteínas e peptídeos antimicrobianos, como a Drosomicina (ZHANG; ZHU, 2009). Apesar de funcionarem em sinergismo, os dois caminhos são ativados de forma independente, ou seja, diferentes classes de micro-organismos induzem padrões de expressão de PAMs específicos, implicando que *Drosophila* é capaz de sentir e discriminar os invasores (LEMAITRE; REICHHART; HOFFMANN, 1997) através do reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelos PRRs (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002).

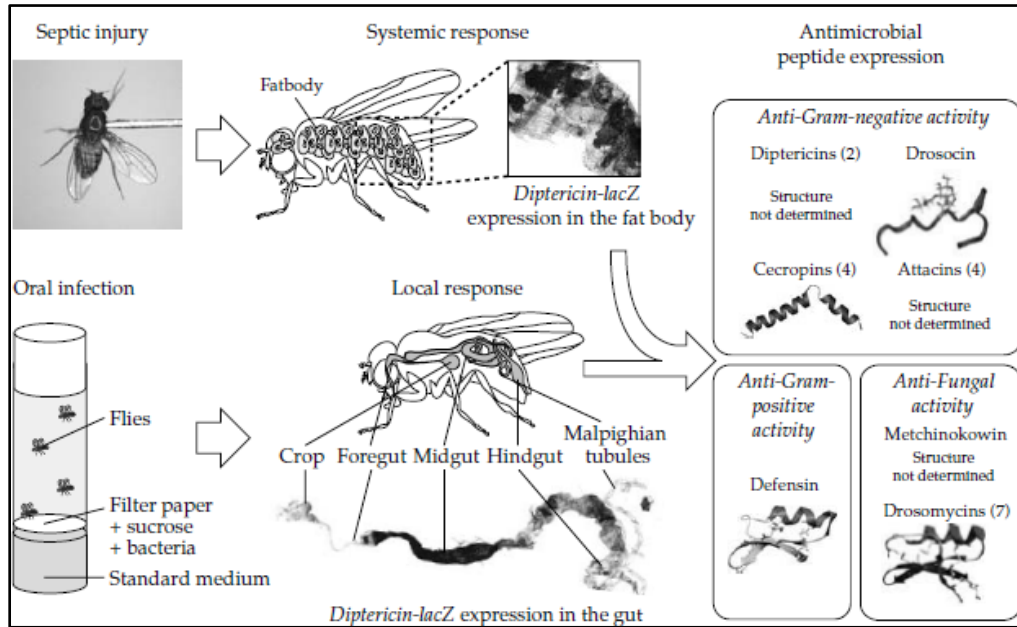


Figura 6 – Visão geral das respostas antimicrobianas de *Drosophila spp.*

Fonte: Broderick, Welchman e Lemaitre (2009).

Apesar das similaridades na resposta inata entre a mosca-das-frutas e os humanos, é importante notar que existem diferenças que impõem uma série de limitações a esse modelo. Primeiro, *Drosophila* não possui resposta adaptativa, ou seja, não possui anticorpos. O sistema imune também não possui células “natural killer”, células dendríticas e citocinas, as quais têm um papel fundamental na resposta imune (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013). No entanto, moscas *Drosophila* têm sido exaustivamente utilizadas em estudos de fatores de virulência de fungos e em testes de antifúngicos *in vivo*. A maior parte dessas pesquisas envolve a utilização de moscas deficientes de Toll, pois as moscas normais são resistentes à maioria dos fungos, como por exemplo, *Candida spp.* (CHAMILOS et al., 2006) e *A. fumigatus* (LIONAKIS et al., 2005). Contudo, a resistência também pode estar ligada à quantidade de fungo inoculada (GLITTENBERG et al., 2011).

A via de infecção fúngica mais comum é através da inoculação traumática de uma solução contendo esporos, conídios ou leveduras no tórax da mosca, com o auxílio de uma agulha fina (LIONAKIS; KONTOYIANNIS, 2012). Dessa forma, o fungo atinge rapidamente a hemolinfa do inseto, se espalhando para as outras partes do corpo (LIONAKIS et al., 2005; CHAMILOS et al., 2006; CHAMILOS et al.,

2008). O resultado da infecção pode ser avaliado pela mortalidade das moscas e pela quantificação da carga fúngica através das técnicas de unidades formadoras de colônia, PCR quantitativa e histologia dos tecidos.

Atualmente, os estudos com *D. melanogaster* estão bem estabelecidos, e incluem: teste de antifúngicos para tratamento de candidose, fusariose e scedosporiose (CHAMILOS et al., 2006; LAMARIS et al., 2007), os quais podem ser colocados no alimento antes ou após a infecção; estudos de virulência entre diferentes espécies de *Candida*, nos quais se observou uma alta correlação da virulência em moscas com a virulência em camundongos (CHAMILOS et al., 2006; GLITTENBERG et al., 2011); comparação de diferentes vias de infecção, como no caso do modelo de aspergilose, no qual comparou-se a mortalidade de *D. melanogaster* após a infecção por injeção, ingestão ou rolamento das moscas nos conídios de *A. fumigatus* (LIONAKIS et al., 2005).

Moscas *D. melanogaster* também são úteis na análise dos potenciais fatores de virulência das infecções fúngicas em humanos, como por exemplo, a sobrecarga de ferro na infecção por Mucorales. Pelo fato do metabolismo do ferro em *D. melanogaster* ter muitas similaridades com o dos mamíferos (MISSIRLIS et al., 2007), Chamilos et al. (2008) testaram se a maior oferta de ferro também regularia a patogênese da mucormicose em moscas. Para testar essa hipótese, os autores adicionaram 100 mg/ml de cloreto de ferro ao alimento das moscas após um breve período de jejum. Como resultado, observou-se 100% de mortalidade no grupo com sobrecarga de ferro em comparação com 65% de mortalidade no grupo controle, após 48 h de experimento, em consonância com a patogenia da doença em humanos (KONTOYIANNIS et al., 2007).

Um fato interessante é que moscas normais ou deficientes de receptores Toll se mostraram resistentes à infecção por *Pneumocystis* spp., demonstrando a especificidade do agente por hospedeiros mamíferos (EVANS et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando-se o iminente papel do íon ferro na etiopatogenia da pitiose e a problemática da sua terapêutica, propôs-se nesta tese estudar o metabolismo do ferro em coelhos com pitiose experimental e avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* de um quelante de ferro para o tratamento da infecção.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o metabolismo do ferro em coelhos infectados experimentalmente por *P. insidiosum*;
- Avaliar a susceptibilidade de 17 isolados de *P. insidiosum* frente ao quelante de ferro deferasirox (Exjade[®], Novartis) *in vitro* e comparar o tratamento com deferasirox sozinho e em combinação com imunoterapia em coelhos com pitiose experimental;
- Avaliar a susceptibilidade de *P. insidiosum* frente à equinocandina micafungina (Mycamine[®], Astellas), sozinha ou em combinação com deferasirox, *in vitro* e em coelhos com pitiose experimental;
- Estudar o mecanismo de ação *in vitro* do deferasirox sobre *P. insidiosum* e *in vivo* através da mensuração da enzima ADA e da avaliação histopatológica das lesões subcutâneas dos coelhos com pitiose;
- Desenvolver um novo modelo experimental para estudo da pitiose utilizando o minimodelo invertebrado da mosca-das-frutas *D. melanogaster* com sobrecarga de ferro.

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1

Percepções sobre a patofisiologia do metabolismo do ferro nas infeções por *Pythium insidiosum*

Artigo publicado no periódico *Veterinary Microbiology*¹.

¹A licença para a inclusão do artigo nesta tese encontra-se no anexo B.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections

R.A. Zanette^{a,d}, P.E.R. Bitencourt^c, S.H. Alves^{a,c,d}, R.A. Figuera^b, M.M. Flores^b,
P. Wolkmer^b, P.A. Hecktheuer^d, L.R. Thomas^d, P.L. Pereira^d,
É.S. Loreto^{a,d}, J.M. Santurio^{a,d,*}

^a Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 September 2012

Received in revised form 22 October 2012

Accepted 25 October 2012

Keywords:

Oomycete
Iron and infection
Anemia
Pythiosis

ABSTRACT

Pythium insidiosum causes life-threatening disease in mammals. Animals with pythiosis usually develop anemia, and most human patients are reported to have thalassemia and the major consequence of thalassemia, iron overload. Therefore, this study evaluated the iron metabolism in rabbits experimentally infected with *P. insidiosum*. Ten infected rabbits were divided into two groups: one groups received a placebo, and the other was treated with immunotherapy. Five rabbits were used as negative controls. The hematological and biochemical parameters, including the iron profile, were evaluated. Microcytic hypochromic anemia was observed in the infected animals, and this condition was more accentuated in the untreated group. The serum iron level was decreased, whereas the transferrin level was increased, resulting in low saturation. The level of stainable iron in hepatocytes was markedly decreased in the untreated group. A high correlation was observed between the total iron binding capacity and the lesion size, and this correlation likely confirms the affinity of *P. insidiosum* for iron. The data from this study corroborate the previous implications of iron in the pathogenesis of pythiosis in humans and animals.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

^d Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Depto. Microbiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

1. Introduction

Pythiosis is a worldwide life-threatening infectious disease in humans and animals that is caused by the oomycete *Pythium insidiosum*. Horses and dogs are the most frequently infected animals, and these animals typically exhibit the cutaneous and gastrointestinal forms, respectively (Grooters, 2003; Gaastra et al., 2010). In humans, the

infection occurs in ophthalmic, cutaneous/subcutaneous and systemic forms, and the majority of human cases have been reported in Thailand (Krajaejun et al., 2006).

People and animals are believed to contract the disease through cutaneous wounds or parasite-induced injury to the gastrointestinal mucosa and close contact with swimming zoospores (Grooters, 2003; Gaastra et al., 2010). Thalassemia has been reported to have a striking association with human pythiosis, which perhaps explains the endemicity of pythiosis in Thailand (Krajaejun et al., 2006), where 1% of the total population is thalassemic.

Iron overload is responsible for the most damaging effects of thalassemias (Schaible and Kaufmann, 2004; Ozment and Turi, 2009). Moreover, iron overload can increase host susceptibility to pythiosis by promoting the

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Depto. Microbiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Predio 20, Sala 4139, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.
Tel.: +55 55 3220 8906;
fax: +55 55 3220 8906.
E-mail address: janio.santurio@gmail.com (J.M. Santurio).

infectivity of the pathogen or by impairing host immunity (Schaible and Kaufmann, 2004; Krajaejun et al., 2006). However, Krajaejun et al. (2006) found six *P. insidiosum*-infected patients who had paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, which shares the common feature of chronic hemolysis with thalassemia but does not share the iron overload state.

Very low hematocrit (Ht) levels are observed in cases of equine pythiosis, which are reported to occur as a result of blood loss through large ulcerated skin lesions (Mendoza and Alfaro, 1986; Gaastra et al., 2010; Santos et al., 2011). Interestingly, the experimental infection is only reproducible in rabbits, which were observed to have anemia without the presence of open wounds (Loreto et al., 2012). Recently, the discovery of a gene encoding a ferrocyclase in *P. insidiosum* has kindled interest in iron metabolism and virulence (Krajaejun et al., 2011). Therefore, to better understand the role of the iron ion in *P. insidiosum* infections, the total iron binding capacity (TIBC); the serum levels of iron, transferrin, and ferritin; and the hepatocyte iron concentration (HIC) were studied in a rabbit model of pythiosis. Additionally, we evaluated the iron metabolism in rabbits treated with an immunotherapeutic product with relatively successful cure rates in animals.

2. Materials and methods

2.1. Animal model

Fifteen 3-month-old female New Zealand rabbits were used in this experiment. All of the animals were dewormed and submitted to a period of 20 days of adaptation prior to the experiment. The Ethical and Animal Welfare committee of the Universidade Federal de Santa Maria approved the methodology used in this experiment (protocol number 72/2010).

Ten rabbits were inoculated with *P. insidiosum* zoospores (isolate LAPEMI 156) by the subcutaneous route as previously described (Santurio et al., 2003; Pereira et al., 2008). Five uninoculated animals were used as negative controls (Group 1). Based on the lesion size at day 25 post-inoculation (PI), the infected animals were divided into two homogeneous groups of five animals: Group 2, composed of animals treated with the saline placebo, and Group 3, which received an immunotherapeutic product (PITIUM-VAC) at 14 days intervals, according to the manufacturer's instructions and data from previous studies (Santurio et al., 2003; Pereira et al., 2008; Santos et al., 2011).

2.2. Clinical and hematological parameters

Fasting blood for hematological and biochemical analyses was collected by cardiac puncture after anesthesia with ketamine and xylazine on days 0 (day of infection), 25, 50, and 75 PI. The serum levels of iron, transferrin, and TIBC were determined using commercial kits (Biotecnica), and the transferrin saturation was calculated. Serum ferritin levels were measured at day 75 using the immunoturbidity assay (Biotecnica). Inoculated rabbits were checked weekly by measuring the subcutaneous

nodular area using a sliding caliper. The animals were also weighed on a weekly basis.

2.3. Post-mortem examination

Animals were killed by exsanguination under anesthesia with sodium pentobarbital (100 mg/kg IV) on day 75 PI. Two 1 cm³ blocks of liver cut from the middle of the left lateral liver lobe were fixed in 10% buffered formalin prior to embedding in paraffin wax and sectioning. Liver histological sections were stained with Prussian blue (potassium ferrocyanate) stain, and the stainable iron content of the parenchymal cells was graded as described previously (Barry, 1997), where 0 represents the absence of stainable liver cell iron, and grades 1–3 represent increasing degrees of parenchymal siderosis. The slides were evaluated in a single-blind study by a veterinary pathologist. Liver morphology was assessed by hematoxylin and eosin staining.

2.4. Statistical analyses

The areas of the lesions (cm²) were submitted to the analysis of variance and Student's *t*-test using a significance level of 5%. The hematological and biochemical results are expressed as the means and standard deviations. The data were found to be normally distributed using the Kolmogorov–Smirnov test, and therefore analysis of variance followed by Tukey's test was used to compare the groups. The results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

The mean baseline size of the subcutaneous lesions was approximately 6 cm² for each group at day 25 PI, and progressively increased to a mean of 15.8 and 9.3 cm² for groups 2 and 3, respectively, on the day 75 PI. The mean lesion areas differed significantly between Groups 2 and 3 ($p < 0.05$). One animal from Group 2 died 30 days PI; the necropsy findings indicated that the disease had spread to the lung tissue. Moreover, animals from Group 1 were significantly heavier than animals from Group 2 ($p < 0.05$),

Table 1

Weight, lesion size, serum ferritin level, and hepatic iron concentration (HIC) in uninfected rabbits (Group 1), rabbits infected with *P. insidiosum* and treated with a placebo (Group 2) and rabbits infected and treated with immunotherapy (Group 3). Data correspond to day 75 post-infection and are shown as the mean \pm SD or as the number of cases.

Characteristic	Group 1 (n = 5)	Group 2 (n = 4)	Group 3 (n = 5)
Weight (kg)	3.5 \pm 0.42	2.6 \pm 0.28*	3.1 \pm 0.54
Lesion size (cm ²)	–	15.8 \pm 6.4	9.3 \pm 2.6**
Ferritin (μ g/L)	4.4 \pm 1.8	21 \pm 4.5*	15.1 \pm 6.3*
HIC (n)			
Grade 0	1	1	1
Grade 1	1	3	1
Grade 2	2	–	1
Grade 3	1	–	2

* $p < 0.05$ compared with the control group.

** $p < 0.05$ compared with the placebo group.

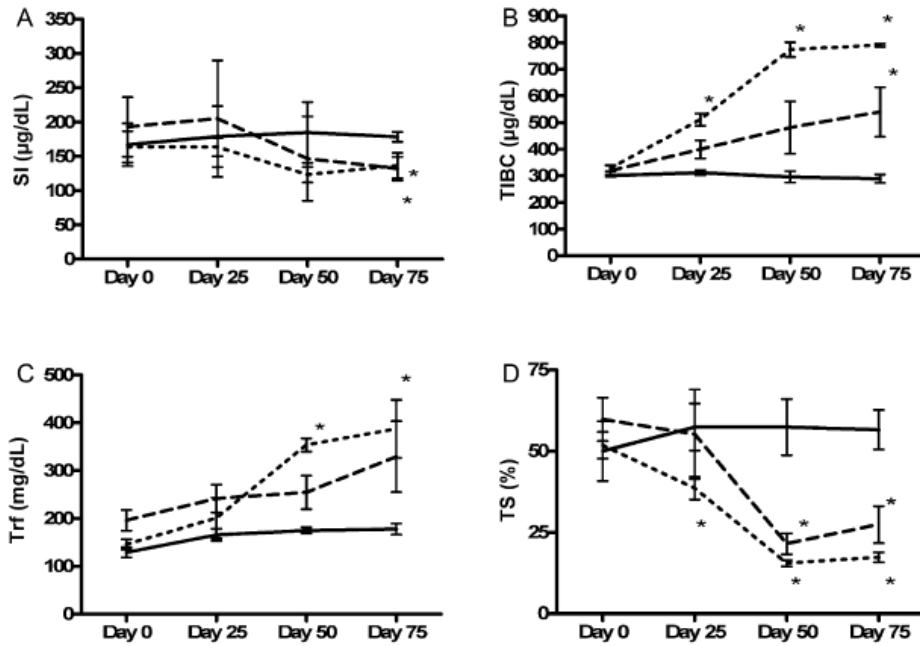


Fig. 1. Mean \pm SD values for the iron profile. Serum iron (A), total iron binding capacity (B), serum transferrin level (C), and transferrin saturation (D). Solid line, Group 1; short dashed line, Group 2; long dashed line, Group 3. Asterisk indicate significant differences compared with Group 1 ($p < 0.05$).

but the weight did not differ from that of Group 3 animals (Table 1). Food consumption did not differ between the infected and negative control animals.

The serum iron profile showed that the *P. insidiosum* infection progressively lead to iron withholding (Fig. 1), which was found to be linearly correlated with the lesion size (Fig. 2). Increased TIBC levels and decreased transferrin saturation were already observed in all infected animals at day 25 PI ($p < 0.05$). The HIC are presented in Table 1. The absence of stainable iron at grades 2 and 3 was observed only in Group 2.

The hematological parameters determined on days 25, 50, and 75 PI are described in Table 2. At the end of the experiment, the hemoglobin (Hb), Ht, mean corpuscular

volume (MCV), and mean corpuscular hemoglobin (MCH) levels were statistically lower ($p < 0.05$) in group 2 than those in the control group, whereas the red cell distribution width (RDW) was higher ($p < 0.05$). The erythrocyte count (RBC) and the Hb and Ht levels were decreased by 7.9, 17 and 17.6%, respectively, in Group 2 ($p < 0.05$), versus 5.5, 9, and 10.6% decreases, respectively, in Group 3, in comparison with the control group. The MCV and the MCH were decreased by 10.8 and 14%, respectively, in Group 2 ($p < 0.05$), versus 4.5 and 6.8% decreases, respectively, in Group 3. The mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) was decreased in the infected animals but did not differ statistically from that of the control group. The RDW was increased by 20% (Group 2, $p < 0.05$) and 13% in Group 3. Together these data demonstrated that rabbits with experimental pythiosis had a microcytic, hypochromic anemia. Leukocytosis with eosinophilia was observed among the infected rabbits but was more accentuated in Group 2 (data not shown).

4. Discussion

We examined the iron metabolism in rabbits experimentally infected with *P. insidiosum*. Iron acquisition from the host plays a pivotal role in successful infection by fungi in humans and animal models (Schaible and Kaufmann, 2004). Patients suffering from elevated available serum iron or increased bone marrow iron stores are at increased risk of developing mucormycosis and aspergillosis, respectively (Ibrahim et al., 2011). An epidemiological study of human patients with pythiosis reported that 81% had underlying diseases, 99% of which were hematological

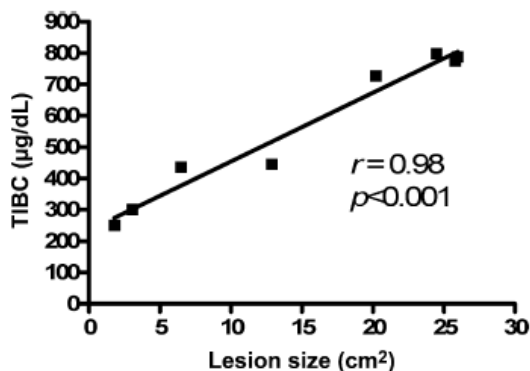


Fig. 2. Relationship between lesion size and total iron binding capacity (TIBC).

Table 2

Mean \pm SD values for the hematological parameters. Red blood cells (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and red cell distribution width (RDW). Group 1, control uninfected; Group 2, treated with placebo; Group 3, treated with immunotherapy. Asterisks indicate significant differences compared with Group 1 ($p < 0.05$).

Parameter	Day 25 PI			Day 50 PI			Day 75 PI		
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 1	Group 2	Group 3	Group 1	Group 2	Group 3
RBC (10^6 mm^3)	5.36 \pm 0.1	5.03 \pm 0.4	5.31 \pm 0.4	6.02 \pm 0.2	5.65 \pm 0.4	5.9 \pm 0.2	5.92 \pm 0.2	5.45 \pm 0.7	5.6 \pm 0.3
Hb (g/dL)	12 \pm 0.4	11.3 \pm 1	12 \pm 0.6	12.8 \pm 0.3	10.7 \pm 1*	12.1 \pm 0.4	12.9 \pm 0.7	10.7 \pm 2.5*	11.7 \pm 1
Ht (%)	35.6 \pm 1.6	33.4 \pm 3.1	35.6 \pm 2	38.5 \pm 1.3	33.9 \pm 3.1*	36 \pm 1.5	38.4 \pm 2.6	31.6 \pm 6.4*	34 \pm 2.9
MCHC (g/dL)	33.7 \pm 0.4	33.8 \pm 0.4	33.7 \pm 1.3	33.3 \pm 0.5	32.8 \pm 0.8	33.6 \pm 0.9	35 \pm 1.2	33.2 \pm 1.5	34.3 \pm 0.5
MCV (fL)	66.5 \pm 2	66.3 \pm 1.2	67 \pm 3.6	64 \pm 2.3	60.1 \pm 3.5*	61.4 \pm 3.8	64 \pm 1.7	57 \pm 2.7*	61.1 \pm 3.4
MCH (pg/L)	22.4 \pm 0.6	22.4 \pm 0.4	22.7 \pm 1.5	21.3 \pm 0.7	19.7 \pm 1.4*	20.6 \pm 1	22.5 \pm 0.21	19.3 \pm 1.4*	21 \pm 1.3
RDW (%)	15.1 \pm 1.1	14.7 \pm 1.1	15.7 \pm 1.3	12.6 \pm 0.4	13 \pm 1.4	12.6 \pm 0.2	11.9 \pm 0.2	14.3 \pm 1.8*	13.4 \pm 1.3

PI – post-inoculation with *P. insidiosum* zoospores.

* $p < 0.05$ in comparison with the control group (Group 1).

disorders, primarily thalassemia (Krajaejun et al., 2006). One of the conundrums remaining to be resolved is why thalassemic patients are at a greater risk of acquiring pythiosis. The iron overload state, which is observed in these patients, has been reported to confer susceptibility to pathogens due to the impairment of both T cell and phagocytic cell function (Mencacci et al., 1997; Schaible and Kaufmann, 2004; Wessling-Resnick, 2010). However, various mechanisms may make excess iron available to microorganisms. Large amounts of iron can also be made available in patients with hemolytic disorders (Ganz and Nemeth, 2009), which perhaps explains the occurrence of pythiosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

Prolonged infection or inflammation often leads to the development of anemia of inflammation (AI), a form of non-specific immunity which is characterized by inadequate erythrocyte production in the context of low serum iron and low iron binding capacity (Ganz and Nemeth, 2009; Wessling-Resnick, 2010). During inflammation, the synthesis of ferritin, an acute-phase reactant molecule, is increased, which explains the high serum ferritin values observed in our study. Moreover, the transferrin, TIBC, MCV, MCH, and RDW indices are usually normal to slightly decreased in individuals with AI (Weiss and Goodnough, 2005). Notwithstanding, the transferrin level, the TIBC, and the RDW were significantly increased in our study, whereas the MCV and the MCH revealed microcytic, hypochromic erythrocytes. These characteristics could be due to decreased iron absorption, but decreased iron absorption plays only a minor role in hypoferrinemia in patients with AI (Jurado, 1997). The progression toward iron depletion began a few days after pythiosis infection, i.e., 25 days PI, and worsened with time, as demonstrated by the high correlation between the TIBC and the lesion size.

The liver is the primary iron storage organ in the body. At low iron loads, the metal is predominantly held in ferritin in the reticuloendothelial cells of the liver. This iron is water-soluble and non-stainable (Barry, 1997). As the stores increase, an increasing proportion of iron spills out of the safer storage compartment and is held as insoluble, stainable hemosiderin in hepatocytes (Ozment and Turi, 2009). Because the HIC closely correlates with the total level of stored iron, it is therefore likely that the infected

rabbits have preserved or increased HIC values induced by AI (Ganz and Nemeth, 2009), but this trend was not observed in our study. Thus, iron sequestration via the normal pathways can be excluded as a cause of AI during *P. insidiosum* infections. Conversely, immunotherapeutically treated rabbits (Group 3) showed increased HIC values. Two possible and not mutually exclusive hypotheses could explain the increased hepatocyte iron uptake. First, CD4+ T cells are constantly stimulated during immunotherapy (Gaastra et al., 2010) to produce interleukin 2 and interferon gamma (IFN γ), which induce a mononuclear immune response. By counteracting the infective agent, less iron is consumed. Second, the IFN γ -induced activation of macrophages down-regulates the transmembrane exporter ferroportin, and therefore, the metal gets “locked up” in the reticuloendothelial storage and is not released to the iron transporter transferrin (Schaible and Kaufmann, 2004; Weiss and Goodnough, 2005). Consequently, *P. insidiosum* growth is likely to be restricted due to the low iron environment.

Microcytic hypochromic anemia was observed in the infected animals and was more severe in the placebo group. Anemia is commonly reported in animals with pythiosis, although the reported etiology varies from blood loss from ulcerated skin lesions in equines (Mendoza and Alfaro, 1986) and intestinal parasitism in a camel with a dry and non-pruritic vulvar pythiosis (Videla et al., 2012) to a wide range of factors in dogs (Grooters, 2003). The rapid increases in the serum transferrin levels and the TIBC, along with the low transferrin saturation, suggest that iron deficiency is the cause of the anemia in the rabbits infected with *P. insidiosum* in our study.

Immunotherapy is a strategy with proven efficacy in animals and humans (Santurio et al., 2003; Gaastra et al., 2010; Santos et al., 2011), because antifungal therapy is scarcely effective (Pereira et al., 2008; Cavalheiro et al., 2009). The mean lesion size for immunotherapeutically treated animals showed a reciprocal relationship with the recovery of hematological parameters, which did not differ statistically from the control group. The iron profile in this group was also less affected throughout the study and, most importantly, although most of the serum iron parameters were statistically decreased at the end of the experiment in comparison to the control group, iron was

stored in parenchymal cells of the liver. These data highlight the curative properties of the immunotherapeutic product.

This study is the first to implicate iron deficiency as a primary or contributory cause of anemia in experimental *P. insidiosum* infections. Our results are strengthened by the report of a gene encoding ferrochelatase in a *P. insidiosum* strain isolated from a Thai patient; this enzyme is required for the final step of the heme biosynthesis (Krajaejun et al., 2011). Azevedo et al. (2012) demonstrated that the Brazilian isolates are all genetically similar and paraphyletic in relation to the Thai isolates. However, iron deficiency is a complex, multifactorial process. The TIBC level should be extrapolated to other animal species to determine whether it represents a good prognostic marker in pythiosis. Given the poor outcomes of pythiosis with current treatments, chelating drugs or iron-sequestering molecules that can restrict iron uptake by the iron-hungry oomycete *P. insidiosum* should be investigated further.

Acknowledgements

This study was funded in part by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil). The first author thanks CAPES (Brazil) for the grant. Érico S. Loreto is recipient of a PNPd-CAPES fellowship.

References

- Azevedo, M.I., Botton, S.A., Pereira, D.I.B., Robe, L.J., Jesus, F.P.K., Mahl, C.D., Costa, M.M., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2012. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. *Vet. Microbiol.* 159, 141–148.
- Barry, M., 1997. Liver iron concentration, stainable iron, and total body storage iron. *Gut* 15, 411–415.
- Cavalheiro, A.S., Zanette, R.A., Spader, T.B., Lovato, L., Azevedo, M.I., Botton, S., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2009. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Vet. Microbiol.* 137, 408–411.
- Gaastera, W., Lipman, L.J.A., De Cock, A.W.A.M., Exel, T.K., Pegge, R.B.G., Scheurwater, J., Vilela, R., Mendoza, L., 2010. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet. Microbiol.* 146, 1–16.
- Ganz, T., Nemeth, E., 2009. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin. Hematol.* 46, 387–393.
- Grooters, A.M., 2003. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 695–720.
- Ibrahim, A.S., Gebremariam, T., Luo, G., Fu, Y., French, S.W., Edwards Jr., J.E., Spellberg, B., 2011. Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron chelation, polyenes, and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1768–1770.
- Jurado, R.L., 1997. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin. Infect. Dis.* 25, 888–895.
- Krajaejun, T., Sathapatayavongs, B., Prachartam, R., Nitiyanant, P., Leelachaikul, P., Wanachiwanawin, W., Chaiprasert, A., Assanasen, P., Saipetch, M., Mootsikapun, P., Chetchothisakd, P., Lekhakula, A., Mitarnun, W., Kalnauwakul, S., Supparatpinyo, K., Chaiwarith, R., Chiewchanvit, S., Tananuvat, N., Srisiri, S., Suankratay, C., Kulwichit, W., Wongsaisuwan, M., Somkaew, S., 2006. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin. Infect. Dis.* 43, 569–576.
- Krajaejun, T., Khositnithikul, R., Lerksuthirat, T., Lowhnoo, T., Rujirawat, T., Petchthong, T., Yingyong, W., Suriyaphol, P., Smittipat, N., Juthayothin, T., Phuntumart, V., Sullivan, T.D., 2011. Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. *Fungal Biol.* 115, 683–696.
- Loreto, E.S., Alves, S.H., Santurio, J.M., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2012. Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Vet. Microbiol.* 156, 222–226.
- Mencacci, A., Cenci, E., Boelaert, J.R., Bucci, P., Mosci, P., Fè d'Ostiani, C., Bistoni, F., Romani, L., 1997. Iron overload alters innate and T helper cell responses to *Candida albicans* in mice. *J. Infect. Dis.* 175, 1467–1476.
- Mendoza, L., Alfaro, A.A., 1986. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. *Mycopathologia* 94, 123–129.
- Ozment, C.P., Turi, J.L., 2009. Iron overload following red blood cell transfusion and its impact on disease severity. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 694–701.
- Pereira, D.I.B., Santurio, J.M., Alves, S.H., Azevedo, M.I., Silveira, F., Costa, F.F., Sallis, E.S.V., Pötter, L., Ferreira, L., 2008. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. *J. Mycol. Med.* 18, 129–133.
- Santos, C.E.P., Marques, L.C., Zanette, R.A., Jesus, F.P.K., Santurio, J.M., 2011. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1397–1399.
- Santurio, J.M., Leal, A.T., Leal, A.B.M., Festugatto, R., Lubeck, I., Sallis, E.S., Copetti, M.V., Alves, S.H., Ferreira, L., 2003. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosi developed and evaluated. *Vaccine* 21, 2535–2540.
- Schaible, U.E., Kaufmann, S.H.E., 2004. Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 946–953.
- Videla, R., van Amstel, S., O'Neill, S.H., Frank, L.A., Newman, S.J., Vilela, R., Mendoza, L., 2012. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). *Med. Mycol.* 50, 219–224.
- Weiss, G., Goodnough, L.T., 2005. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1011–1023.
- Wessling-Resnick, M., 2010. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu. Rev. Nutr.* 30, 105–122.

3.2 Artigo 2

**Terapia de quelação de ferro como tratamento para
Pythium insidiosum em um modelo animal**

Artigo publicado no periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*²

²A licença para a inclusão do resumo do artigo nesta tese encontra-se no anexo C.

Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model

R. A. Zanette^{1,2}, S. H. Alves^{1,2}, M. B. Pilotto², C. Weiblen^{2,3}, R. A. Figuera³, P. Wolkmer³, M. M. Flores³ and J. M. Santurio^{1,2*}

¹Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil; ²Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Depto Microbiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil; ³Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

*Corresponding author. Tel/Fax: +55-55-32208906; E-mail: janio.santurio@gmail.com

Received 5 November 2012; returned 5 December 2012; revised 12 December 2012; accepted 19 December 2012

Objectives: Iron plays an important role in the pathogenesis of *Pythium insidiosum*. Human pythiosis frequently occurs in iron-overloaded thalassaemic patients and experimentally infected animals develop iron deficiency anaemia. Therefore, we sought to determine the *in vitro* and *in vivo* activities of the iron chelator deferasirox against *P. insidiosum*.

Methods: *In vitro*, the MIC and minimum fungicidal concentration (MFC) values of deferasirox for 17 strains of *P. insidiosum* were determined in accordance with CLSI document M38-A2. *In vivo* studies were carried out in 20 inoculated rabbits divided into four groups: placebo, immunotherapy obtained from vortexed *P. insidiosum* cultures (14 day intervals), deferasirox (15 mg/kg/day) and a combination of immunotherapy and deferasirox. Five non-infected animals were used as controls.

Results: The MIC and MFC values of deferasirox for *P. insidiosum* ranged from 12.5 to 50 mg/L and from 50 to 100 mg/L, respectively. Treatment with deferasirox alone ameliorated anaemia and normalized the serum iron levels and hepatic iron concentration in the animals. However, the mean lesion size, although decreased, did not differ significantly from that in the placebo group. The results of immunotherapy plus iron chelation therapy were worse than those of immunotherapy alone. Moreover, the disease spread to the lung tissue in 5 out of 10 deferasirox-treated animals.

Conclusions: Despite its limited *in vitro* and *in vivo* activity, deferasirox improved iron deficiency anaemia in *P. insidiosum*-infected rabbits. Further studies are needed to investigate the immunomodulatory properties observed in this study and the benefits and drawbacks of using iron-chelating drugs as an adjuvant therapy in pythiosis.

Keywords: deferasirox, susceptibility, antifungal therapy, oomycete

3.3 Artigo 3

***Drosophila* deficiente em *Toll* é susceptível à
infecção por *Pythium insidiosum***

Artigo publicado no periódico *Microbiology and Immunology*³

³A licença para a inclusão do artigo nesta tese encontra-se no anexo D.

NOTE

Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infectionRégis A. Zanette^{1,2}, Janio M. Santurio¹, Érico S. Loreto¹, Sydney H. Alves¹ and Dimitrios P. Kontoyiannis²¹Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil and ²Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Boulevard, Houston, TX 77030, USA**ABSTRACT**

There is a paucity of animal models of pythiosis, a life-threatening disease of humans and animals, the immunopathogenesis of which is poorly understood. A pythiosis model was developed by injecting *Toll* (*Tl*)-deficient *Drosophila melanogaster* flies with *Pythium insidiosum* zoospores. The infected *Tl* mutant flies had significantly lower survival rates (73.7%) than did control flies. This study reveals the important role of *Tl* pathway activation in fly immune response to pythiosis.

Key words mini-host models, pythiosis, *Toll* receptors.

Pythiosis is an uncommon, yet life threatening disease in humans and animals that is caused by the oomycete *P. insidiosum*. Its clinical presentation varies between different hosts. In humans, the commonest sites of infection are the arteries and eyes; thalassemic patients with iron overload are particularly susceptible to this infection (1). The cutaneous/subcutaneous form predominates in horses and cattle, whereas in dogs a gastrointestinal presentation is more common (2). Unusual presentations such as granulomatous rhinitis in sheep (3) and vulvar pythiosis in camels (4) have also been reported. Reported cases in non-mammalian hosts are rarer, being restricted to a bird (5) and a mosquito larva (6).

The disease is acquired through biflagellate zoospores penetrating previously injured skin or intestinal epithelium (7). Although the factors influencing disease acquisition are largely unknown, iron uptake is postulated to be a major determinant of establishment of *P. insidiosum* infection (8, 9). Interestingly, experimental inoculation of *P. insidiosum* zoospores into mammals has been un-

successful in inducing the disease, the exception being rabbits, which remain the only available experimental model for the study of pythiosis (7).

The fruit fly *D. melanogaster* has been used to study a variety of phylogenetically diverse fungal infections, including aspergillosis (10), candidiasis (11) and mucormycosis (12). On challenge with a pathogen, activation of the evolutionarily conserved *Tl* signaling pathway leads to rapid and selective induction of antimicrobial peptides in fly hemolymph, allowing *D. melanogaster* to successfully combat fungi (13). To that end, we sought to establish a model of pythiosis using *D. melanogaster* flies.

Oregon^R flies were used for *wt* flies. *Tl*-deficient transheterozygote mutants were generated by crossing flies carrying a thermosensitive allele of *Tl* (*Tl*⁶³²) with flies carrying a null allele of *Tl* (*Tl*^{RXA}), as described elsewhere (10). Standard procedures were used for manipulation, feeding, and housing of flies in all experiments (10, 12). Each experiment was performed at least in triplicate on different days using 25–30 female

Correspondence

Dimitrios P. Kontoyiannis, Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, Unit 1460, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Boulevard, Houston, TX 77030, USA.

Tel: +1 713-792-6237; fax: +1 713 745 6839; email: dkontoyi@mdanderson.org

Received 26 April 2013; revised 10 July 2013; accepted 12 July 2013.

List of Abbreviations: CMA, corn meal agar; *D. melanogaster*, *Drosophila melanogaster*; *P. insidiosum*, *Pythium insidiosum*; *Tl*, *Toll*; *wt*, wild-type.

Pythiosis in fruit flies

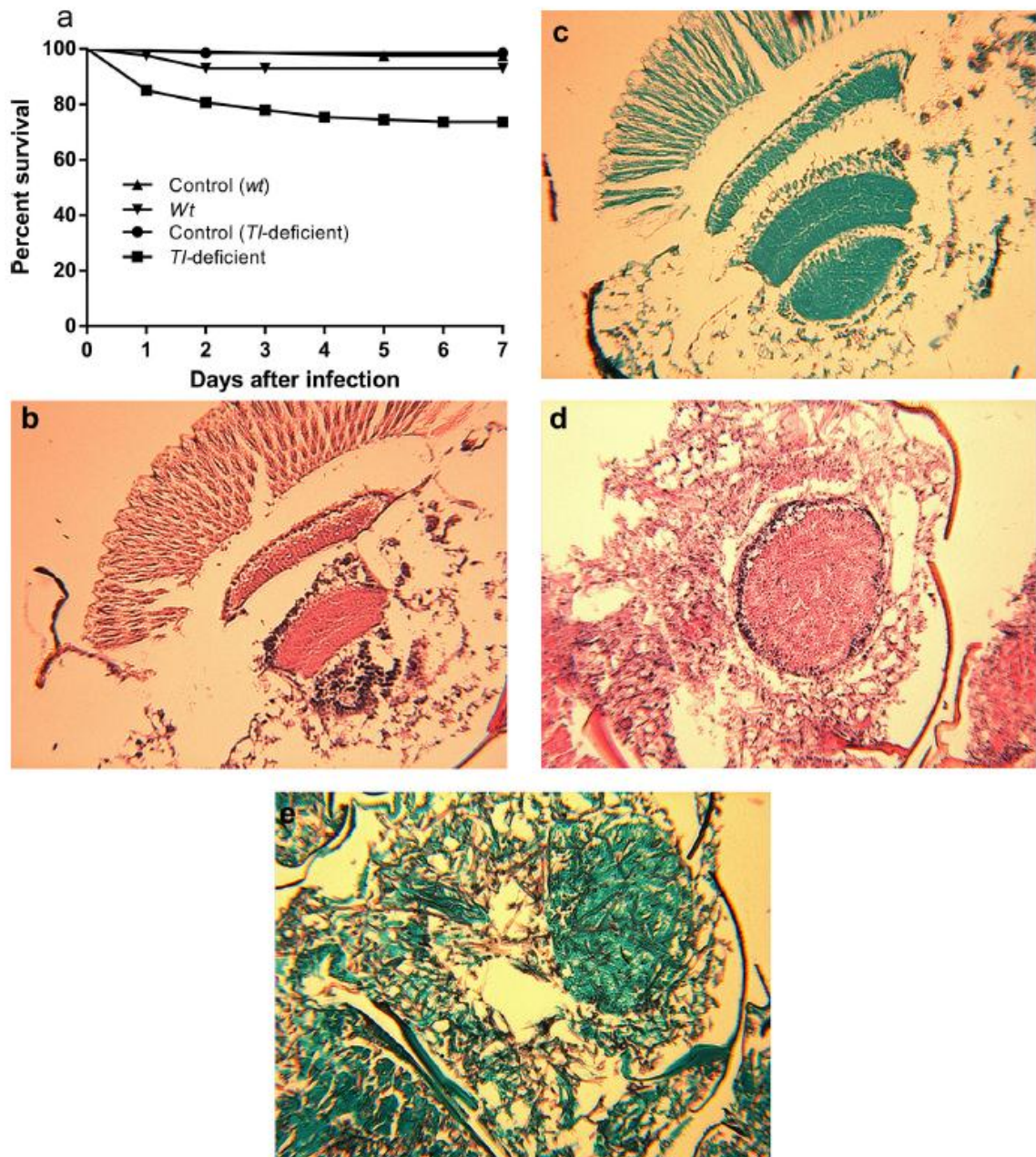


Fig. 1. (a) Estimated survival curves of wt and *Tl*-deficient flies infected by injection of 10^5 zoospores/mL of *P. insidiosum*. $P = 0.28$ for wt versus control flies (injected with sterile PBS); $P < 0.0001$ for *Tl*-deficient flies versus controls. Data shown are the means of three independent experiments ($n = \sim 30$ flies/group). (b and c) Representative histopathological sections of the head (stained with HE and Grocott–Gomori methenamine-silver nitrate) of wt and (d and e) *Tl* mutant flies 48 hr after infection. *P. insidiosum* hyphae are seen as dark staining all over the heads of *Tl*-deficient flies, including the eyes, which are depicted in the centers of the panels.

flies that were 2–4 days old on each occasion. Three *P. insidiosum* strains isolated from equine pythiosis cases that had been used in previous studies (9) and a reference strain from the Central Bureau voor Schimmelcultures

(CBS 101555) were tested. The infective zoospores were obtained in liquid medium by following standard procedures (9). *Wt* and *Tl*-mutant flies were infected by intrathoracic injection with a thin sterile needle

previously dipped in a concentrated solution of 10^5 zoospores/mL. To determine whether increased iron availability promotes infectivity of *P. insidiosum*, flies were housed in empty vials for 6–8 hr to starve them and then transferred to vials with food containing iron (FeCl_3 ; 100 mg/mL), as previously described (12). Uptake of iron was assessed using a colorimetric assay (10).

After injection, the flies were housed at 29°C, fed on standard fly food and transferred to fresh vials every 2 days. Dead flies were fixed with 10% (v/v) formaldehyde, processed and embedded in paraffin wax for histological examination. Dead flies were also collected, ground in 1 mL of 0.85% NaCl solution and the supernatant plated in CMA and incubated at 37°C. In all experiments, survival of the flies was assessed daily until Day 7 after injection. Survival curves were plotted using Kaplan–Meier analysis, and differences in survival rates between the groups analyzed using the log-rank test. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 6.01; GraphPad Software). $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

The optimal inoculum was determined by observing fly mortality after infecting *wt* and *Tl*-deficient flies with needles that had been dipped into different concentrations of inoculum. Fly mortality was not observed at concentrations below 10^5 zoospores/mL. Thus, a concentration of 1×10^5 zoospores/mL was used for subsequent infections. Infected *Tl* mutant flies had significantly lower survival rates (73.7%; $P < 0.0001$) at Day 7 post-inoculation than control flies (98.6%) that had been inoculated with sterile PBS (Fig. 1a). As evidenced by histopathological studies, injected *P. insidiosum* zoospores germinated rapidly in fly hemolymph to form hyphae that subsequently disseminated and invaded the thorax, abdomen and head of *Tl* mutant flies, leading to death (Fig. 1d,e). Conversely, no histopathological alterations were found in *wt* flies (Fig. 1b,c), indicating that they are resistant to *P. insidiosum* infection ($P > 0.05$; Fig. 1a).

P. insidiosum growth was observed after 48 hr incubation of CMA plates plated with supernatant of dead *Tl*-deficient flies. No significant differences in mortality were observed among the four *P. insidiosum* isolates used (data not shown). Therefore, the strain LAPEMI 290 was used for all subsequent experiments.

Because iron seems to have a fundamental role in pythiosis (1, 8, 9), we postulated that increased iron availability also modulates pathogenesis of this infection in flies, as observed in a fly model of zygomycosis (12). Notwithstanding, *wt* flies fed with iron-containing food remained resistant to infection and *Tl*-deficient flies did not have increased mortality (Fig. 2). That the low virulence observed in both experiments was due to the

relative small inoculum size cannot be ruled out. However, because *P. insidiosum* zoospores are difficult to obtain we were not able to obtain enough to investigate the effect of increasing the inoculum concentration. The injector pumping method, which injects precise volumes directly into *Drosophila* hemolymph, would be a way of further exploring more virulent inoculums in order to reach more accurate conclusions on the role of *Tl* signaling and iron availability in fly defense against pythiosis (14). Despite recent advances in *P. insidiosum* genetic and genomic data, it is still a mystery how this primary plant pathogen has become a threat for humans and animals and what role iron plays in the pathogenesis of pythiosis (8). Therefore, *D. melanogaster* is a particularly attractive model host for facilitating large scale testing of mutant libraries: such *P. insidiosum* experimental infections have never been tried before.

In conclusion, our study showed that *Tl*-deficient *D. melanogaster* flies are susceptible to *P. insidiosum* infection and could be a phylogenetically reduced alternative

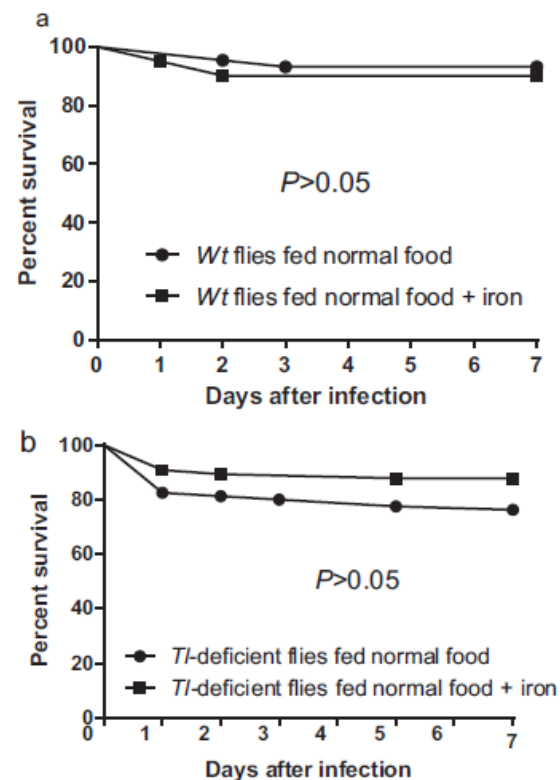


Fig. 2. Estimated survival curves of wild-type (a) (*wt*) and (b) *Tl*-deficient flies fed normal fly food or iron-containing food and infected by injection of 10^5 zoospores/mL of *P. insidiosum*. Data shown are the means of three independent experiments ($n \sim 30$ flies/group).

Pythiosis in fruit flies

model for the study of pythiosis. As there is a paucity of animal models of pythiosis, we believe that this novel experimental system will contribute to elucidation of the mechanisms of *P. insidiosum* virulence and therapy for pythiosis.

ACKNOWLEDGMENTS

D.P.K. acknowledges an MD Anderson Cancer Center core grant (CA 16672) and a Frances King Black Endowment. This study was supported in part by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq—Brazil). É.S.L. is a recipient of a PNPD-CAPES fellowship. We thank Nathaniel D. Albert for invaluable technical support.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Krajaeun T., Sathapatayavongs B., Prachartam R., Nitiyanant P., Leelachaikul P., Wanachiwanawin W., Chaiprasert A., Assanasen P., Saipetch M., Mootsikapun P., Chetchoisakd P., Lekhakula A., Mitarnun W., Kalnauwakul S., Supparatpinyo K., Chaiwarith R., Chiewchanvit S., Tananuvat N., Srisiri S., Suankratay C., Kulwichit W., Wongsaisuwan M., Somkaew S. (2006) Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* **43**: 569–76.
- Martins T.B., Kommers G.D., Trost M.E., Inkelmann M.A., Figuera R.A., Schild A.L. (2011) A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. *J Comp Path* **146**: 122–31.
- Santurio J.M., Argenta J.S., Schwendler S.E., Cavalheiro A.S., Pereira D.I.B., Zanette R.A., Alves S.H., Dutra V., Silva M.C., Arruda L.P., Nakazato L., Colodel E.M. (2008) Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. *Vet Rec* **163**: 276–7.
- Videla R., van Amstel S., O'Neill S.H., Frank L.A., Newman S.J., Vilela R., Mendoza L. (2012) Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). *Med Mycol* **50**: 219–24.
- Pesavento P.A., Barr B., Riggs S.M., Eigenheer A.L., Pamma R., Walker R.L. (2008) Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. *Vet Pathol* **45**: 538–41.
- Schurko A.M., Mendoza L., de Cock A.W., Klassen G.R. (2003) Evidence for geographic clusters: molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. *Mycologia* **95**: 200–8.
- Mendoza L., Hernandez F., Ajello L. (1993) Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J Clin Microbiol* **31**: 2967–73.
- Krajaeun T., Khositnithikul R., Lerksuthirat T., Lowhnoo T., Rujirawat T., Petchthong T., Yingyong W., Suriyaphol P., Smittipat N., Juthayothin T., Phuntumart V., Sullivan T.D. (2011) Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. *Fungal Biol* **115**: 683–96.
- Zanette R.A., Alves S.H., Pilotto M.B., Weiblen C., Figuera R.A., Wolkmer P., Flores M.M., Santurio J.M. (2013) Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model. *J Antimicrob Chemother* **68**: 1144–7.
- Lionakis M.S., Lewis R.E., May G.S., Wiederhold N.P., Albert N.D., Halder G., Kontoyiannis D.P. (2005) *Toll*-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *J Infect Dis* **191**: 1188–95.
- Glittenberg M.T., Silas S., MacCallum D.M., Gow N.A.R., Ligoxygakis P. (2011) Wild-type *Drosophila melanogaster* as an alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*. *Dis Model Mech* **4**: 504–14.
- Chamilos G., Lewis R.E., Hu J., Xiao L., Zal T., Gilliet M., Halder G., Kontoyiannis D.P. (2008) *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 9367–72.
- Lemaitre B., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1997) *Drosophila* host defense: differential expression of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14614–9.
- Apidianakis Y., Rahme L.G. (2009) *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat Protoc* **4**: 1285–94.

3.4 Artigo 4

Micafungina sozinha e em combinação com deferasirox contra *Pythium insidiosum*

Artigo submetido ao periódico *Journal of Infection and Chemotherapy*⁴

⁴O comprovante de submissão do artigo encontra-se no anexo E.

1 **Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against**

2 *Pythium insidiosum*

3
4 **Micafungin and deferasirox against *Pythium insidiosum***

5
6 R.A. Zanette,¹ F.P.K. Jesus,² M.B. Pilotto,³ C. Weiblen,³ L. Pötter⁴, L. Ferreiro²,

7 S.H. Alves,¹ and J.M. Santurio^{1,*}

8
9 *Programa de Pós-graduação em Farmacologia at Universidade Federal de Santa*
10 *Maria (UFSM), Brazil¹; Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias at*
11 *Universidade Federal de Porto Alegre (UFRGS), Brazil²; Laboratório de Pesquisas*
12 *Micológicas (LAPEMI) at UFSM, Brazil³; and Departamento de Zootecnia at UFSM,*
13 *Brazil⁴.*

14
15 *Corresponding author:

16 Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Postal Code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

17 Phone/fax: +55 55 32208906.

18 E-mail: janio.santurio@gmail.com

19

20 **Abstract**

21 This study evaluated the *in vitro* and *in vivo* activity of micafungin (MICA)
22 alone and in combination with the iron chelator deferasirox (DEF) against *Pythium*
23 *insidiosum*. MICA showed a poor *in vitro* activity when it was used alone, but
24 synergistic interactions were observed for 88.2% of the strains when the drug was
25 combined with DEF. Smaller lesions were observed in rabbits receiving the
26 combination therapy, although it favored disease dissemination to the lungs. The present
27 results show that MICA alone is ineffective against *P. insidiosum*, and the combination
28 MICA-DEF might have deleterious effects for the host.

29 **Keywords:** oomycete; echinocandin; iron chelator; susceptibility.

30

31 *Pythium insidiosum* is an oomycete of the kingdom Straminipila that infects wild
32 and domestic animals, mainly in the subcutaneous and gastrointestinal presentations,
33 and humans in one of the four presentations: vascular, cutaneous/subcutaneous, ocular
34 and disseminated [1, 2, 3]. Vascular or disseminated pythiosis is the most severe clinical
35 entity, and the patients usually have an underlying thalassemia-hemoglobinopathy
36 syndrome and its major pathological change – iron overload [3]. In animals, a
37 predisposing factor is yet to be discovered because recurrent infections are commonly
38 observed in endemic areas [2].

39 It is a consensus that the successful management of pythiosis requires early
40 recognition and prompt treatment [1]. The use of combination antifungal therapy in
41 treating *P. insidiosum* infection has paved the way for new treatment strategies,
42 including the use of drugs of different pharmaceutical classes [4, 8]. The iron chelator
43 deferasirox (DEF) was found to be highly active against Mucorales and *Aspergillus*
44 *fumigatus*, both as monotherapy or in combination therapy [5, 6]. Against *P. insidiosum*,

45 DEF has been found to have limited activity *in vitro*, although the treatment in rabbits
46 improved anemia [7]. Therefore, we sought to evaluate the *in vitro* activity of the
47 echinocandin micafungin (MICA) alone and in combination with DEF against 17 strains
48 of *P. insidiosum* and in rabbits with experimental pythiosis.

49 Sixteen Brazilian *P. insidiosum* strains obtained from equines with pythiosis,
50 and which were used in previous studies [4, 7], and a standard strain (CBS 101555)
51 were included in this experiment. MICA (Astellas Pharma, US) and DEF (Novartis
52 Pharma AG, Switzerland) were dissolved in sterile distilled water and dimethyl
53 sulfoxide, respectively, and serially diluted in RPMI 1640 broth containing L-glutamine
54 and buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid. The range of
55 drug concentrations for use in the checkerboard assay was of 0.5 – 128 mg/L for MICA
56 and 0.39 – 100mg/L for DEF.

57 The susceptibility of the *P. insidiosum* strains to the drugs was tested by
58 microdilution, following the CLSI M38-A2 protocol [8]. The inoculum consisting of *P.*
59 *insidiosum* zoospores was adjusted according to previous studies [4, 5, 9]. For DEF
60 susceptibility tests, strains were starved of iron as described elsewhere [6], with
61 exception that *P. insidiosum* isolates were grown in corn meal agar instead of
62 Sabouraud dextrose agar. For each strain tested, a positive (inoculum diluted) and
63 negative control (only RPMI) was performed. The interaction of the combination was
64 evaluated by the checkerboard microdilution method [10, 11]. The microplates were
65 incubated at 37°C for 24 h. For DEF alone and in combination with MICA, Minimum
66 Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest drug concentration at which
67 there was 100% of inhibition of fungal growth by visual readings. The Minimal
68 Fungicidal Concentration (MFC) was determined by plating 100 µl from MIC tubes
69 with no growth onto corn meal agar plates which were incubated at 37°C for 72 h. For

70 MICA alone, minimal effective concentration (MEC), defined as the lowest drug
71 concentration at which morphological alterations of the hyphal cells are detected, was
72 determined. The tests were carried out in duplicate. The same strains were tested again
73 at the same conditions in another day. The interactions, based on the respective
74 fractional inhibitory concentration index (FICI), were interpreted as the following: FICI
75 ≤ 0.5 , synergism; FICI > 0.5 to ≤ 4 , indifference; FICI > 4 , antagonism. FICIs were
76 obtained using the formula $FICI = (\text{MIC of drug A in combination} / \text{MIC of drug A}$
77 $\text{alone}) + (\text{MIC of drug B in combination} / \text{MIC of drug B alone})$ [10]. Off-scale MICs
78 were converted to the next higher dilution for calculation purposes.

79 For the *in vivo* tests, fifteen 3-month-old female New Zealand rabbits were
80 divided into three groups of five animals. All the animals were inoculated with *P.*
81 *insidiosum* zoospores (isolate LAPEMI 232) by the subcutaneous route as previously
82 described [11]. Group 1 (placebo) received saline intraperitoneally. Animals in group 2
83 were treated with 2 mg/kg/day MICA by the intraperitoneal route. Animals in group 3
84 were treated with 15 mg/kg/day DEF dissolved in orange juice and administered by oral
85 gavage, according to the manufacturer's instructions, and the same dosage of MICA
86 used in group 2. Doses were based on previous studies with rabbits [7, 12, 13].
87 Treatments started at day 25 after zoospore inoculation (week 0) and lasted for 35 days
88 (week 5). Inoculated rabbits were checked weekly by measuring the subcutaneous
89 nodular area using a sliding caliper.

90 The areas of the lesions (cm^2) were found to have normal distribution and were
91 submitted to analysis of variance and Tukey's test using a significance level of 5%.
92 Differences among treatments were also tested for significance using linear, quadratic
93 and cubic regression equations. The Ethical and Animal Welfare committee of the

94 Universidade Federal de Santa Maria approved the methodology used in this
95 experiment.

96 The *in vitro* activities of MICA and DEF against *P. insidiosum* are shown in
97 Table 1. All the isolates showed MICs above 128 mg/L for MICA, while MECs of 16
98 and 32 mg/L were observed for 70% and 30% of the isolates, respectively. MICs for
99 DEF ranged from 12.5 to 50 mg/L, and the MFC was of 100 and 50 mg/L for 82 and
100 18% of the isolates, respectively. In general, individual drugs showed only weak
101 antifungal activity or none. However, the combination of MICA and DEF exhibited
102 synergistic effects against 88% of the isolates. Antagonistic effects were not indicated.

103 The subcutaneous lesions grew in a different fashion among groups and showed
104 a linear behavior for all treatments ($P < 0.001$) (Fig. 1). Mean lesion areas of the MICA
105 treated group did not differ from the placebo group. Lesions of the MICA-DEF group
106 were smaller in comparison to the other groups and were closest to be significant ($P =$
107 0.06). However, three animals of this group had to be euthanized before the end of the
108 experiment due to respiratory failure. *P. insidiosum* positive cultures were obtained
109 from the lung lesions.

110 High MICs and lack of fungicidal activity *in vitro* with limited fungistatic activity *in*
111 *vivo* were observed by using caspofungin acetate against clinical isolates of *P.*
112 *insidiosum* [9]. Interestingly, the authors found no morphological alterations in the
113 hyphae; therefore, it was not possible to determine the MEC of the isolates. In our
114 study, MICs for MICA were above 128 mg/L, but it was possible to determine the MEC
115 values, which constitute a more appropriate method for evaluating the susceptibility to
116 echinocandins [14]. Nonetheless, our *in vivo* results indicated that MICA activity
117 against *P. insidiosum* was poor, mainly because MIC and MEC values were far above
118 therapeutic levels observed in rabbits [12].

119 Iron chelation therapy with DEF in dual or triple combination with polyenes and
120 echinocandins has demonstrated to be more effective than the drugs used alone against
121 murine mucormycosis or aspergillosis [5, 6]. DEF MICs and MFCs against *P.*
122 *insidiosum* strains were equal or higher than the results observed for *A. fumigatus*,
123 which is thought to be less sensitive to iron deprivation than Mucorales or to have
124 enhanced capability to either acquire external or maintain internal stores of iron [6].
125 Indeed, DEF monotherapy against *P. insidiosum* has shown limited efficacy in vivo [7].
126 In this study, we demonstrated that MICs for the combination DEF-MICA were
127 decreased to plasma levels achievable in rabbits [12, 13], and which are comparable to
128 those observed in humans [15]. These data corroborate with the significant trend
129 towards reduced subcutaneous lesions observed in group 3.

130 One surprising finding was the need to euthanize 3/5 animals of the MICA-DEF
131 group in the setting of pulmonary disease. A detrimental effect of such combination was
132 already observed in the treatment of murine models of pulmonary aspergillosis and
133 mucormycosis, although not worse than the placebo group [5]. However, we believe
134 that the dissemination of the disease to the lung tissue was due to the protean
135 immunomodulatory properties of DEF, since this phenomenon has been reported in *P.*
136 *insidiosum* infected rabbits treated with DEF monotherapy [7].

137 In conclusion, low susceptibility of *P. insidiosum* to MICA was observed when
138 the drug was used alone. Synergistic interactions were observed when MICA was
139 combined with DEF in vitro and in vivo. However, the dissemination of the disease to
140 the internal organs observed in some of the animals receiving the iron chelator makes it
141 impossible to draw reliable conclusions at this time.

142

143

144 **Acknowledgments**

145 This study was sponsored by the National Council of Scientific and
146 Technological Development – CNPq and by the Laboratório de Pesquisas Micológicas
147 of the Universidade Federal de Santa Maria. The first author would like to thank the
148 Brazilian agency CAPES-FAPERGS for the scholarship grant.

149

150 **References**

- 151 1. Sudjaritruk T, Sirisanthana V. Successful treatment of a child with vascular
152 pythiosis. *BMC Infect Dis.* 2011;11:33.
- 153
- 154 2. Santos CEP, Marques LC, Zanette RA, Jesus FPK, Santurio JM. Does
155 immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium*
156 *insidiosum*? *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18:1397-9.
- 157
- 158 3. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Pracharktam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P,
159 Wanachiwanawin W, et al. Clinical and epidemiological analyses of human
160 pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis.* 2006;43:569-76.
- 161
- 162 4. Mahl DL, Jesus FPK, Loreto ES, Zanette RA, Pilotto MA, Alves SH, et al. In
163 vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics
164 and tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4021-3.
- 165
- 166 5. Ibrahim AS, Gebremariam T, Luo G, Fu Y, French SW, Edwards JE, et al.
167 Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron

- 168 chelation, polyenes, and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;
169 55:1768-70.
- 170
- 171 6. Ibrahim AS, Gebremariam T, French SW, Edwards JE, Spellberg B. The iron
172 chelator deferasirox enhances liposomal amphotericin B efficacy in treating
173 murine invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2010;
174 65:289-92.
- 175
- 176 7. Zanette RA, Alves SH, Pilotto MB, Weiblen C, Figuera RA, Wolkmer P, et al.
177 Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model.
178 *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:1144-7.
- 179
- 180 8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution
181 antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. 2nd ed.
182 M38-A2. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- 183
- 184 9. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Pötter L, Spanamberg A, et al.
185 Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum*
186 strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:1168-71.
- 187
- 188 10. Cavalheiro AS, Maboni G, Azevedo MI, Argenta JS, Pereira DIB, Spader TB, et
189 al. In vitro activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against
190 *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2136-8.
- 191

- 192 11. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH.
193 Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:693-
194 715.
195
- 196 12. Groll AH, Mickiene D, Petraitis V, Petraitiene R, Ibrahim KH, Piscitelli SC, et
197 al. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal
198 echinocandin lipopeptide micafungin (FK463) in rabbits. *Antimicrob Agents*
199 *Chemother.* 2001;45:3322-7.
200
- 201 13. Weiss HM, Fresneau M, Camenisch GP, Kretz O, Gross G. In vitro blood
202 distribution and plasma protein binding of the iron chelator deferasirox
203 (ICL670) and its iron complex Fe-[ICL670]₂ for rat, marmoset, rabbit, mouse,
204 dog, and human. *Drug Metab Dispos.* 2006;34:971-5.
205
- 206 14. Espinel-Ingroff A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar
207 diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to
208 caspofungin acetate (MK-0991). *J Clin Microbiol.* 2003;41:403-9.
209
- 210 15. Suzuki T, Uno T, Chen G, Ohashi Y. Ocular distribution of intravenously
211 administered micafungin in rabbits. *J Infect Chemother* 2008;14:204-7.
212
213
214
215

216 **Table 1.** *In vitro* activity of micafungin in combination with deferasirox against
 217 *Pythium insidiosum*.

Isolate ^a	Micafungin ^b			Deferasirox ^c			FICI ^d (interpret)
	MEC	A	B	MFC	A	B	
CBS 101555	16	256	32	100	50	12.5	0.4 (S)
LAPEMI 120	16	256	32	100	50	6.25	0.3 (S)
LAPEMI 135	16	256	64	100	25	6.25	0.5 (S)
LAPEMI 137	16	256	32	50	25	6.25	0.4 (S)
LAPEMI 138	16	256	32	100	50	12.5	0.4 (S)
LAPEMI 143	16	256	32	50	12.5	6.25	0.6 (I)
LAPEMI 178	16	256	16	100	25	12.5	0.6 (I)
LAPEMI 187	32	256	32	100	50	6.25	0.3 (S)
LAPEMI 210	16	256	32	100	50	6.25	0.3 (S)
LAPEMI 219	16	256	16	100	25	6.25	0.3 (S)
LAPEMI 223	16	256	16	100	50	6.25	0.2 (S)
LAPEMI 227	16	256	32	100	50	6.25	0.3 (S)
LAPEMI 232	32	256	32	50	25	6.25	0.4 (S)
LAPEMI 247	32	256	64	100	25	6.25	0.5 (S)
LAPEMI 253	32	256	32	100	50	6.25	0.3 (S)
LAPEMI 254	16	256	32	100	50	6.25	0.3 (S)
LAPEMI 260	32	256	64	100	25	6.25	0.5 (S)

218 ^aCBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures; LAPEMI, Laboratório de Pesquisas
 219 Micológicas.

220 ^bMEC, minimal effective concentration; A, MIC of micafungin alone; B, MIC of
 221 micafungin in combination.

222 ^cMFC, minimal fungicidal concentration; A, MIC of deferasirox alone; B, MIC of
 223 deferasirox in combination;

224 ^dFICI, fractional inhibitory concentration index; interpret, interpretation; S, synergistic;
 225 I, indifferent.

226

227

228

229

230 **Figure legends**

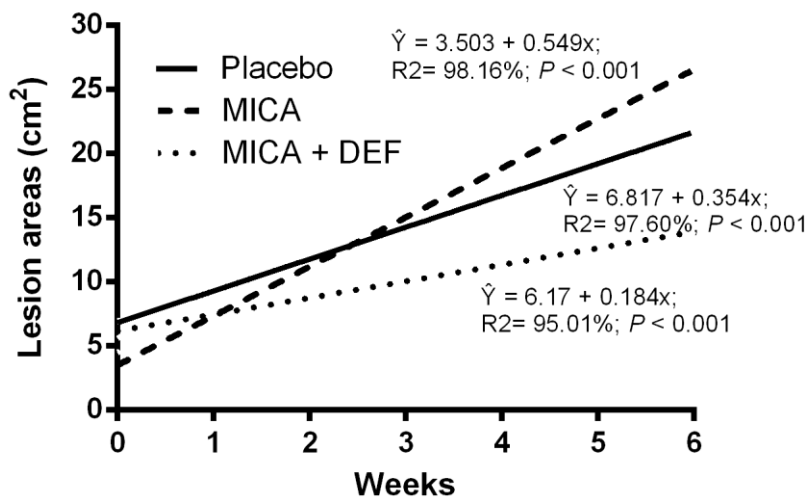
231

232 **Fig. 1.** Mean lesion areas in rabbits experimentally inoculated with *P.*
 233 *insidiosum* zoospores. Treatments started on week 0 and ended on week 5. Linear
 234 regression showed that lesions in the MICA + DEF group grew at a slower rate than the
 235 MICA alone and placebo groups. Likewise, analysis of variance indicated a significant
 236 trend towards difference between MICA + DEF and placebo groups ($P = 0.06$).

237

238

Figure 1.



3.5 Artigo 5

A atividade do deferasirox contra *Pythium insidiosum* é atenuada por ferro *in vitro* e simula os efeitos da imunoterapia *in vivo*

Artigo submetido ao periódico *Microbes and Infection*⁵

⁵ O comprovante de submissão do artigo encontra-se no anexo F.

Deferasirox activity against *Pythium insidiosum* is attenuated by iron in vitro and simulates the effects of immunotherapy in vivo

Régis A. Zanette^a, Paula E.R. Bitencourt^b, Dimitrios P. Kontoyiannis^d, Rafael A. Fighera^c, Mariana M. Flores^c, Priscila S. Sabino^b, Aline Ludwig^a, Maria Beatriz Moretto^b, Sydney H. Alves^{a,b}, Janio M. Santurio^{a,*}

^aGraduate Program in Pharmacology, Health Science Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^bGraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

^cGraduate Program in Veterinary Medicine, Health Science Center, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartment of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

***Corresponding author:** Dr. Janio M. Santurio, Depto. Microbiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. Tel/Fax: +55 55 32208906.

E-mail: janio.santurio@gmail.com

Abstract

Pythium insidiosum iron acquisition mechanisms are unknown. We previously showed that the iron chelator deferasirox had weak activity in vitro and in lesions of rabbits with experimental pythiosis. Here we show that deferasirox causes damage to *P. insidiosum* hyphae in vitro, but that activity is diminished in the presence of exogenous iron. The activity of the catabolic enzyme adenosine deaminase and the histological pattern observed in pythiosis lesions of rabbits treated with deferasirox were similar to the ones in animals treated with immunotherapy.

Keywords: Pythiosis; iron metabolism; adenosine deaminase.

1. Introduction

Infections by the oomycete *Pythium insidiosum* often cause cutaneous, gastrointestinal, ocular or systemic disease in humans and animals. Despite significant advances in diagnosis and treatment, pythiosis remains a difficult-to-treat infection, characterized by causing necrotizing eosinophilic and granulomatous inflammation and by being frequently refractory to antifungal therapy [1, 2].

It is known that the purinergic system participates in immune system modulation during infections, including in pythiosis [3]. In particular, an enhanced adenosine production results from the ATP released into the extracellular space by injured or pathogen-stimulated cells, thus limiting hyperergic inflammatory responses [3]. In turn, the enzyme adenosine deaminase (ADA) represents a crucial biological mechanism aimed at counteracting excessive extracellular adenosine production and avoiding potential toxicity [4, 5]. Moreover, ADA has been found to participate in the regulation of several immune cell types, including macrophages, lymphocytes, neutrophils and dendritic cells [4].

Iron is essential for the pathogen and the host, and not only iron deficiency but iron overload can significantly impair immune function by altering T and B cell proliferation [6]. The predisposition of thalassemic, iron overloaded patients to pythiosis, the observation of iron deficiency anemia in rabbits experimentally infected with *P. insidiosum* [7] and the report of a ferrochelatase gene in *P. insidiosum* has elicited interest in the role of iron in pythiosis [8].

The iron chelator deferasirox has shown potential as a therapeutic intervention for pathogenic fungi [9, 10]. Therefore, it was hypothesized that this

drug would be of interest in patients with pythiosis, firstly acting as an iron chelator in patients with underlying iron overload and second as adjuvant antifungal therapy [2]. Notwithstanding, deferasirox showed a weak activity against *P. insidiosum* strains both in vitro and in vivo where slightly decreased subcutaneous lesions were observed when compared to placebo-treated animals [7]. To better understand the mechanisms of action of deferasirox on *P. insidiosum*, we evaluated the activity of deferasirox *in vitro* and in lesions of rabbits treated with the iron chelator and/or immunotherapy.

2. Materials and methods

2.1. *In vitro* assays

2.1.1. *P. insidiosum* growth rate

We determined the time course of deferasirox-induced hyphal damage with the use of the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) colorimetric assay. Triplicate Eppendorf tubes containing 10^3 *P. insidiosum* zoospores (strain CBS 101555) diluted in 1 mL RPMI 1640 broth and deferasirox at the MIC concentration (50 µg/ml) [7], iron (0.125% FeCl) [9], or both, were incubated at 37 °C on a rotary shaker. Drug-free RPMI 1640 was used as the control medium. At the 0-, 4-, 8-, 12-, 16-, 20- and 24-h time points, tubes were removed from incubation and the XTT (Sigma) assay was performed as described previously [11]. The optical density curves were measured at 405 nm with use of a plate reader (PowerWave HT; BioTek). Wells without zoospores served as blank controls.

2.1.2. DiBAC viability staining

To determine whether deferasirox causes damage to *P. insidiosum* hyphae, we performed viability staining with bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC) (Molecular Probes, Carlsbad, CA). *P. insidiosum* zoospores were incubated in Eppendorf tubes with RPMI 1640 plus 0.15% (wt/vol) Junlon (Nihon Junyaku, Tokyo, Japan) at 37 °C with shaking for 4 h. Tubes were centrifuged at 4,000 g to remove the media, and germlings were resuspended in RPMI containing deferasirox at the MIC concentration, 0.125% iron or both. Drug-free medium served as negative control. After 6 h incubation at 37 °C with shaking, DiBAC staining was performed as described [11]. After the final wash, the samples were immediately suspended for fluorescent microscopy at room temperature.

2.2. *In vivo* assays

Twenty 3-month-old female rabbits were inoculated subcutaneously with 17,000 *P. insidiosum* zoospores [12]. They were the same animals previously used in another study (Zanette et al., 2013). The infected animals were treated by oral gavage with 15 mg/kg/day deferasirox, subcutaneous immunotherapy (PitiumVac[®], LAPEMI/EMBRAPA, Brazil) at 14 d intervals, a combination of both, or placebo, with treatment starting 25 d post-infection [7]. At day 75, animals were anesthetized and euthanized following approved procedures. The subcutaneous lesions were measured using a slide caliper, removed, rinsed in deionized water and 1-cm thick slices were sampled away from the edge of the lesions. Half of the samples was fixed in 10% buffered formalin and the other half was stored at -80°C until assay. The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria.

2.2.1. Histopathological evaluation.

Samples fixed in formalin were routinely processed for histopathological evaluation and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

2.2.2. Enzymatic assays.

Lesion slices were washed and homogenized in (1:10, w/v) 50 mM phosphate buffer solution (pH 7) on ice using a tissue homogenizer. The homogenate was centrifuged at 10,000 X g for 60 min and clear upper supernatant fluids were used for protein and ADA activity measurements. Protein was determined by the method of Lowry et al. [13], and ADA activity was estimated spectrophotometrically as described by Giusti [14], using 75 μ M ammonium sulphate as ammonium standard. The results were expressed as U/L/mg of protein.

2.3. Statistical analysis

The variables were compared among groups by one-way analysis of variance and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). Furthermore, a Pearson's correlation analysis was performed to evaluate the relationship between mean lesion areas and enzymatic activities.

3. Results

3.1. Iron availability is essential for *P. insidiosum* growth

P. insidiosum zoospores in RPMI 1640 medium reached a peak of growth at 16 h of incubation. The iron chelator deferasirox strongly inhibited *P.*

insidiosum growth, and this inhibition was partially abrogated by the concomitant addition of 0.125% FeCl₃ (**Fig. 1**). Interestingly, the growth rate of *P. insidiosum* supplemented with iron was lesser than the observed in the control medium (RPMI only).

3.2. Deferasirox damages *P. insidiosum* hyphae

The DiBAC staining showed enhanced fluorescence, indicating fungicidal activity, mainly in the subapical compartments of *P. insidiosum* germlings treated with deferasirox at the MIC concentration (**Fig. 2a**), when compared to untreated controls (**Fig. 2b**). Increased DiBAC uptake was also observed in the group treated with deferasirox and iron (**Fig. 2c**), and in a lesser degree in the group treated only with iron (**Fig. 2d**).

3.3. Deferasirox treatment mimics immunotherapy in rabbits with experimental pythiosis

The impact of deferasirox in modulating the immune response was compared to immunotherapy by histopathological analysis and by measuring ADA activity in the lesions of rabbits with experimental pythiosis. Lesions in the placebo group showed eosinophilic necrosis surrounded by macrophages, epithelioid cells, multinucleated giant cells and a few plasma cells and lymphocytes. In contrast, cellular infiltrates mainly composed of plasma cells and lymphocytes were observed in H&E stained lesions for all treated groups (**Fig. 3A**). The histological data are concordant with the increase observed in lesion ADA activity in deferasirox and/or immunotherapy-treated groups when compared to placebo ($P < 0.05$; **Fig. 3B**). Moreover, a negative correlation

between ADA activity and mean lesion sizes was observed in our study (Fig. 3C).

4. Discussion

In assessing the effect of iron on *P. insidiosum* growth in vitro, it was noted that the use of the iron chelator deferasirox fully abrogated hyphal growth. Our results are consistent with Minn et al. [15], who also reported that the addition of exogenous iron to growth medium did not enhance the growth of *C. albicans*, probably because trace levels of iron in RPMI medium allow fungi to grow very well [9, 15]. The green fluorescence observed mainly in hyphae treated with deferasirox indicates that the iron chelator has an ability to damage the hyphae [9]. Notwithstanding, enhanced DiBAC uptake was also observed in the group treated only with iron, suggesting that 0.125% FeCl₃ could have been toxic for *P. insidiosum* in vitro.

Iron overload is known to exacerbate fungal infections such as aspergillosis, candidiasis and mucormycosis by enhancing aggressive proliferation of microbes in host tissue [10, 15, 16]. Apart from direct effects on pathogen replication, the elevated iron availability also impairs host immune responses [17]. This is observed in patients with thalassemia or hemochromatosis, which frequently have reduced CD8+ T-cell counts that respond positively to iron chelation therapy [6]. Current evidence shows that the mechanisms of cure of the immunotherapeutic treatment against pythiosis are based on the switch from a Th2 (eosinophils) to a Th1 (macrophages and lymphocytes) subset [3]. Therefore, the impact of deferasirox in modulating the immune response was compared to immunotherapy by histopathological

analysis and by measuring ADA activity in the lesions of rabbits with experimental pythiosis. Microscopical evaluation of the lesions demonstrated that the immunomodulatory mechanisms of the iron chelator were histologically similar to the immunotherapy, i.e., a switch from a Th2 to a Th1 cellular pattern. The increase in ADA activity observed in the treated groups emphasizes the critical role played by ADA in lymphocyte proliferation and in Th2/Th1 cytokine production and differentiation [4]. By inhibiting the proliferation of T cells and the secretion of cytokines, tissue adenosine accumulation exerts potent anti-inflammatory and immunosuppressive actions locally. Therefore, the treatment with deferasirox and/or immunotherapy counteracted the modulating actions of adenosine, as also observed by the negative correlation between ADA activity and mean lesion sizes in our study.

Decreased lymphocyte ecto-ADA activity has been reported before in rabbits with pythiosis, which was also reversed by immunotherapy [3]. These data corroborate previous studies showing that deferasirox treatment enhanced the host inflammatory response to mucormycosis [10] and that ADA therapy inhibited IL-4-induced tissue adenosine accumulation in C57BL/6 transgenic mice [18]. IL-4 also contributes to down-regulation of macrophage effector functions through enhancement of iron assimilation in macrophages and suppression of nitric oxide synthesis further promoting microbial growth [17, 19]. In fact, the results of our study represent a suitable basis for further strategies using ADA therapy in animal models of pythiosis.

In conclusion, we show that deferasirox activity against *P. insidiosum* hyphae in vitro is hampered by the addition of exogenous iron. As Th1 cytokines and T-cell activation stimulate and Th2 cytokines inhibit ADA

expression [3, 4, 5], we believe that the immunomodulatory properties of deferasirox in rabbits with pythiosis were similar to those triggered by immunotherapy, a switch from an initial Th2 to a Th1 response.

Acknowledgments

We thank Nathaniel Albert and Fazal Shirazi for invaluable technical support. This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – CAPES/FAPERGS.

References

- [1] Sudjaritruk T, Sirisanthana V, Successful treatment of a child with vascular pythiosis, *BMC Infect Dis* 11 (2011) 33.
- [2] Schloemer NJ, Lincoln AH, Mikhailov TA, Collins CL, Di Rocco JR, Kehl SC, Chusid MJ, Fatal disseminated *Pythium insidiosum* infection in a child with Diamond-Blackfan anemia, *Infect Dis Clin Pract* 21 (2013) e24-e26.
- [3] Bach BC, Leal DBR, Jaques JAS, Souza VCG, Ruchel JB, Schlemmer KB, Zanette RA, Hecktheuer PA, Pereira PL, Casali EA, Alves SH, Santurio JM, E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. *Cell Biochem Funct* 31 (2013) 476-481.
- [4] Antonioli A, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F, Blandizzi C, Fornai M, Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders, *Curr Drug Targets* 13 (2012) 842-862.
- [5] Bellé LP, Bitencourt PER, Bona KS, Zanette RA, Moresco RN, Moretto MB, Expression of CD26 and its association with dipeptidyl peptidase IV activity in lymphocytes of type 2 diabetes patients, *Cell Biochem Biophys* 61 (2011) 297-302.
- [6] Schaible UE, Kaufmann HE, Iron and microbial infection, *Nature Rev Microbiol* 2 (2004) 946-953.

[7] Zanette RA, Alves SH, Pilotto MB, Weiblen C, Figuera RA, Wolkmer P, Flores MM, Santurio JM, Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model, *J Antimicrob Chemother* 68 (2013) 1144-1147.

[8] Krajaejun T, Khositnithikul R, Lerksuthirat T, Lowhnoo T, Rujirawa T, Petchthong T, Yingyong W, Suriyaphol P, Smittipat N, Juthayothin T, Phuntumart V, Sullivan TD, Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*, *Fungal Biol* 115 (2011) 683-696.

[9] Lewis RE, Pongas GN, Albert N, Bem-Ami R, Walsh TJ, Kontoyiannis DP, Activity of deferasirox in *Mucorales*: Influences of species and exogenous iron, *Antimicrob Agents Chemother* 55 (2011) 411-413.

[10] Ibrahim AS, Gebermariam T, Fu Y, Lin L, Hussein MI, French SW, Schwartz J, Skory CD, Edwards Jr JE, Spellberg BJ, The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation, *J Clin Invest* 117 (2007) 2649-2657.

[11] Ben-Ami R, Lewis RE, Tarrand J, Leventakos K, Kontoyiannis DP, Antifungal activity of colistin against *Mucorales* species in vitro and in a murine model of *Rhizopus oryzae* pulmonary infection, *Antimicrob Agents Chemother* 54 (2010) 484-490.

[12] Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Festugatto L, Lubeck I, Sallis ESV, Copetti MV, Alves SH, Ferreiro L, Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosa developed and evaluated, *Vaccine* 21 (2003) 2535-2540.

[13] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193 (1951) 265-267.

[14] Giusti G, Adenosine deaminase, in Bergmeyer HV (Ed), *Methods of enzymatic analysis*, Academic Press, New York, NY, 1974, pp 1092-1099.

[15] Minn Y, Brummer E, Stevens DA, Effect of iron on fluconazole activity against *Candida albicans* in presence of human serum or monocyte-derived macrophages, *Mycopathologia* 138 (1997) 29-35.

[16] Kontoyiannis DP, Chamilos G, Lewis RE, Giralt S, Cortes J, Raad II, Manning JT, Han X, Increased bone marrow iron stores is an independent risk factor for invasive aspergillosis in patients with high-risk hematologic malignancies and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Cancer* 110 (2007) 1303-1306.

[17] Johnson EE, Wessling-Resnick M, Iron metabolism and the innate immune response to infection, *Microbes Infect* 14 (2012) 207-216.

[18] Ma B, Blackburn MR, Lee CG, Homer RJ, Liu W, Flavell RA, Boyden L, Lifton RP, Sun CX, Young HW, Elias JA, Adenosine metabolism and murine

strain-specific IL-4-induced inflammation, emphysema, and fibrosis, *J Clin Invest* 116 (2006) 1274-1283.

[19] Weinberg ED, Modulation of intramacrophage iron metabolism during microbial cell invasion, *Microbes Infect* 2 (2000) 85-89.

Fig. 1. XTT reduction assay. *P. insidiosum* zoospores were grown in RPMI 1640 in the presence of deferasirox (50 µg/ml), 0.125% iron (FeCl₃) or both. No growth was observed in the presence of deferasirox at the MIC concentration (50 µg/ml). The addition of iron abrogated the inhibitory effect of deferasirox, but the treatment with FeCl₃ alone did not promote growth to levels compared to control (RPMI only). Values represent the means ± SEM of three separate experiments.

Fig. 2. DiBAC viability stain. *P. insidiosum* germlings were exposed to deferasirox at the MIC (50 µg/ml) (b1, b2), 0.125% iron (c1, c2) or both (d1, d2) for 6h. Untreated germlings were used as negative controls (a1, a2). Mycelia subsequently were stained with DiBAC and observed with bright-field (a1 to d1) and fluorescent microscopy (a2 to d2). The fluorescence of the dark pictures is indicative of hyphal damage.

Fig. 3. A) Representative histological sections of rabbit pythiosis lesions (H&E stain, 40x magnification). a) Placebo, area of necrosis and fibroplasia with eosinophilic infiltrate and rare lymphocytes and plasma cells; b) immunotherapy, area of fibroplasia with increased number of lymphocytes and plasma cells and moderate quantities of eosinophils and macrophages; c) deferasirox, area of fibroplasia mainly composed of lymphoplasmacytic infiltrate and rare eosinophils; d) deferasirox and immunotherapy, area of fibroplasia with prominent lymphoplasmacytic infiltrate and rare eosinophils. **B)** Expression of ADA in rabbit pythiosis lesions. ADA activity was significantly increased in all treated groups when compared to placebo. Values are shown as means ± SEM. **C)** A negative correlation was observed between lesion ADA activity and lesion size.

Figure 1

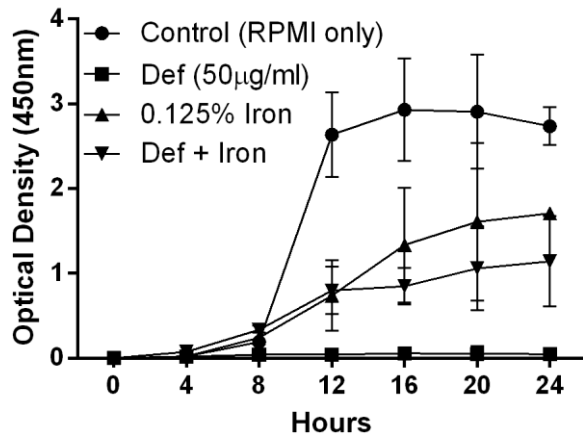


Figure 2

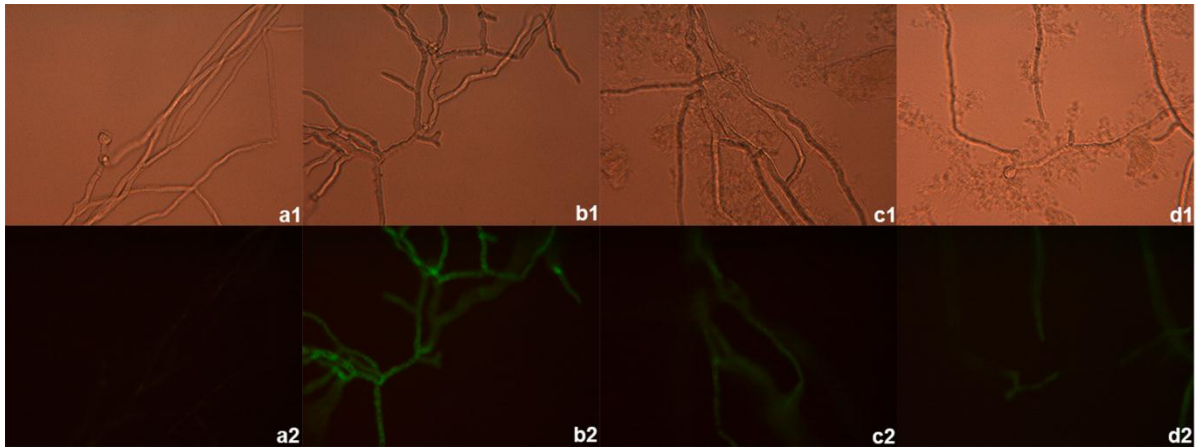
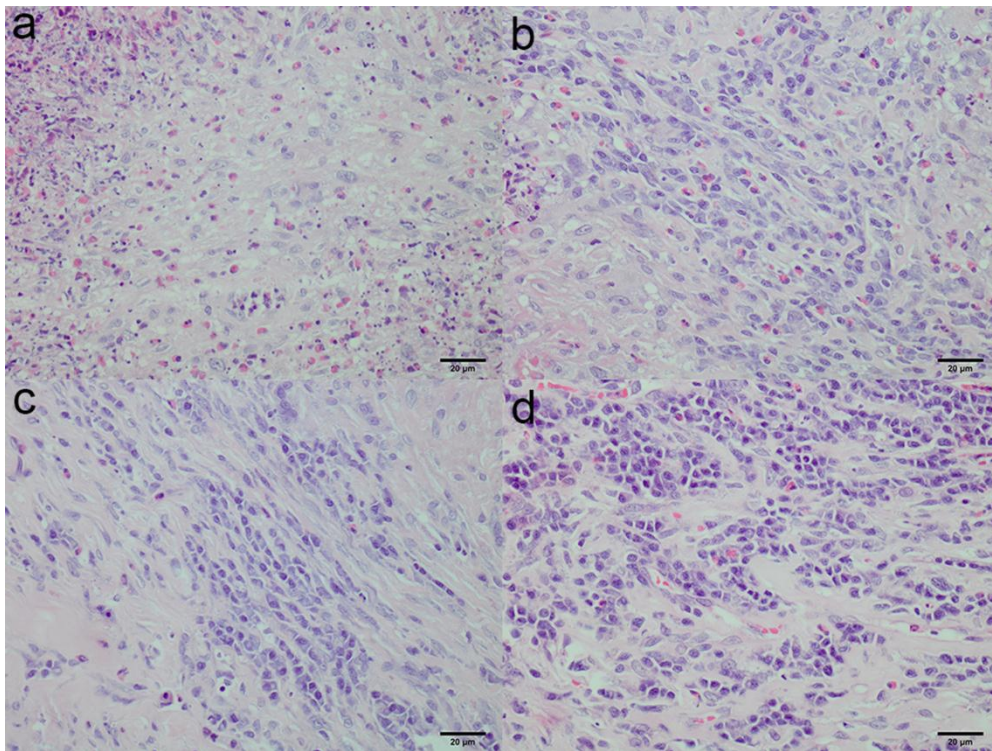
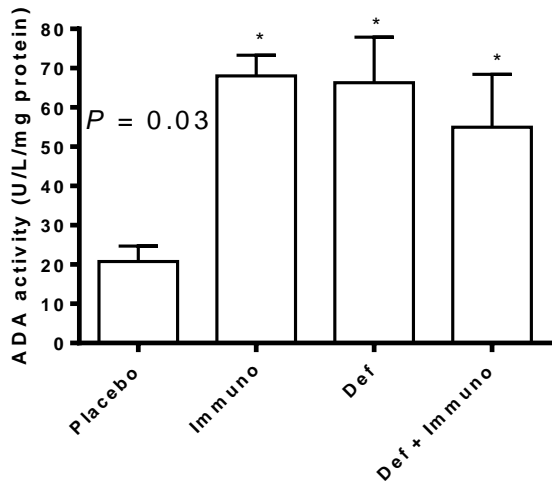


Figure 3

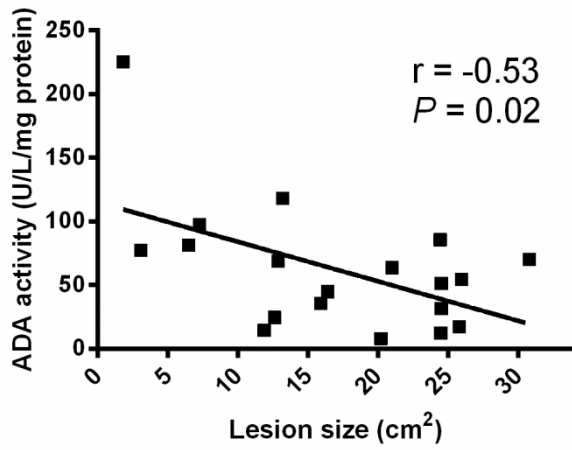
A



B



C



4 DISCUSSÃO

Para sobreviver e replicar em hospedeiros vertebrados, aproximadamente todos os invasores microbianos precisam assegurar a obtenção de ferro do hospedeiro. Em contrapartida, uma das primeiras linhas de defesa contra as infecções é o sequestro de nutrientes para prevenir o crescimento microbiano, um processo chamado imunidade nutricional (SKAAR, 2010; POTRYKUS et al., 2013), e a forma mais significativa dessa imunidade é a segregação de ferro (WESSLING-RESNICK, 2010).

Apesar de controverso (MENDOZA; PRASLA; AJELLO, 2004), um dos fatores predisponentes à pitiose em humanos é a presença de desordens hematológicas (PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; KRAJAEJUN et al., 2006b). Essas hematopatias, entre elas a talassemia, que é a desordem mais comum encontrada em pacientes com pitiose, cursam com sobrecarga de ferro ou com hemólise e consequente liberação do ferro dos eritrócitos (RIVELLA, 2009). São frequentes os relatos de anemia em diferentes espécies com pitiose (MILLER; CAMPBELL, 1983; MONTEIRO, 1999; GROOTERS, 2003), inclusive em coelhos experimentalmente infectados com *P. insidiosum* (LORETO et al., 2012), os quais não possuem lesões ulcerativas que cursam com perda de secreção serossanguinolenta. Além desses fatores, a descoberta recente de um gene codificador de uma ferroquelatase nesse oomiceto (KRAJAEJUN et al., 2011), motivaram a realização do presente estudo. Os resultados iniciais, reportados no **Artigo 1**, demonstram que a infecção por *P. insidiosum* em coelhos altera consideravelmente o metabolismo do ferro. Um fator crucial nesse estudo foi diferenciar a anemia da inflamação da anemia por deficiência de ferro. A primeira é geralmente classificada como normocrômica, normocítica, enquanto que a apresentação hipocrômica, microcítica é mais frequente na segunda. No entanto, devem-se determinar os níveis de ferro circulantes e armazenados para uma conclusão mais fidedigna (ANDREWS, 1999; WEISS; GOODNOUGH, 2005).

Dentro das variáveis bioquímicas analisadas neste estudo que sugerem anemia ferropriva, podemos citar o aumento da CTLF e dos níveis de transferrina sérica, os quais estão diminuídos ou normais na anemia da inflamação (WEISS;

GOODNOUGH, 2005; WESSLING-RESNICK, 2010). Além disso, observou-se um agravamento desses parâmetros com a cronicidade da doença, culminando com uma baixa nos estoques hepáticos de ferro, demonstrados com a coloração de azul da Prússia. O fígado é um dos principais órgãos armazenadores de ferro, primeiramente na forma de ferritina, e conforme os estoques aumentam, na forma de hemossiderina, a qual pode ser corada pela técnica de Azul da Prússia (BARRY, 1974). Era de se esperar que no caso de uma anemia da inflamação os estoques estivessem inalterados ou até mesmo aumentados, pelo aprisionamento de ferro nesse órgão (OZMENT; TURI, 2009; McDONALD et al., 2010). Contudo, a análise semiquantitativa dos cortes histológicos demonstrou redução dos estoques de ferro nos coelhos infectados por *P. insidiosum* e que não receberam tratamento com imunoterápico.

Como a acumulação de ferro por fungos patogênicos está geralmente associada à virulência, espera-se que fármacos que tenham como alvo os mecanismos de sequestro de ferro do hospedeiro tenham considerável valor terapêutico (CRICHTON, 2001). Foi com base nessa premissa que se passou a testar a utilização de quelantes de ferro em modelos experimentais de infecção por fungos (VAN CUTSEM; BOELAERT, 1989; IBRAHIM et al., 2006). Entre os diversos estudos envolvendo diferentes espécies patogênicas, rotas de infecção e quelantes, destacaram-se os estudos envolvendo o quelante deferasirox para o tratamento das infecções por Mucorales, fungos que têm grande afinidade por ferro (IBRAHIM et al., 2007; SPELLBERG; IBRAHIM, 2010). Pela dificuldade de tratamento desses patógenos pela antifungoterapia e devido aos resultados promissores em modelos experimentais, optou-se por incluir o deferasirox na terapia de humanos com mucormicose (REED et al., 2006; KONTOGHIORGHES et al., 2008; SPELLBERG et al., 2012).

Frente à hipótese de afinidade por ferro por este oomiceto, ao sucesso da quelação de ferro para o tratamento de outros fungos e aos resultados reportados no **Artigo 1**, o objetivo do **Artigo 2** foi avaliar *in vitro* e em *in vivo* a atividade do deferasirox frente a isolados de *P. insidiosum*. Os resultados, entretanto, foram decepcionantes, demonstrando que o oomiceto é pouco susceptível ao fármaco. Destaca-se ainda a observação da disseminação da doença para os pulmões em parte dos animais tratados com deferasirox, um fenômeno cujos mecanismos carecem de compreensão.

Estudos em camundongos com aspergilose e mucormicose pulmonares evidenciaram sinergismo na combinação de deferasirox com anfotericina B ou micafungina (IBRAHIM et al., 2010; 2011). Apesar de grande parte da composição da parede celular de *Pythium* spp. ser composta por β -glucanas (HENDRIX, 1964; MOORE-LANDECKER, 1996), estudos anteriores demonstraram baixa ação *in vitro* da caspofungina frente a isolados de *P. insidiosum*, e ação meramente fungistática em coelhos com pitiose (PEREIRA et al., 2007; 2008b). Fundamentado nessa literatura, o objetivo do **Artigo 4** foi avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* da equinocandina micafungina, sozinha ou em combinação com o quelante de ferro deferasirox, frente ao oomiceto *P. insidiosum*. *In vitro*, observou-se que as CIMs e as CFMs da micafungina foram elevadas, não sendo uma boa opção terapêutica. Contudo, diferentemente da caspofungina (PEREIRA et al., 2007), foi possível observar alterações morfológicas nas hifas, o que constitui a CEM (ESPINEL-INGROFF, 2003), que foi de 16 $\mu\text{g/ml}$ para a maioria dos isolados. Porém, foi observado sinergismo em 88% dos isolados quando a micafungina foi associada ao deferasirox, sendo que a CIM do deferasirox na combinação foi de 6,25 $\mu\text{g/ml}$ para 82% dos isolados, níveis marcadamente mais altos que as concentrações plasmáticas dos fármacos após a administração em coelhos (GROLL et al., 2001; WEISS et al., 2006). Deve-se atentar para o efeito paradoxal já levantado por outros autores quando se usa uma equinocandina e um fármaco de outra classe (ELEFANTI et al., 2013b), pois o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) deve ser sempre calculado com base nas concentrações isofetivas, *i.e.*, as concentrações que produzem o mesmo efeito em determinado nível, como por exemplo, 10% de inibição de crescimento, ação fungicida ou inibição metabólica (BERENBAUM, 1989). Como a CIM corresponde a 100% de inibição de crescimento, e a CEM corresponde à menor concentração na qual se observa a presença de hifas aberrantes e se correlaciona com inibição proeminente de 50% do crescimento (ANTACHOPOULOS et al., 2007), optou-se pelo uso das CIMs dos fármacos para o cálculo do ICIF nesse estudo.

Corroborando com os resultados *in vitro* o menor tamanho das lesões nos coelhos tratados concomitantemente com ambos os fármacos. Os resultados da combinação, tanto *in vitro* quanto *in vivo* revelar-se-iam promissores não fosse o fato de 3/5 dos coelhos terem desenvolvido a forma pulmonar da doença, como já observado nos coelhos tratados com deferasirox no **Artigo 2**. Essa disseminação da

doença, comprovada através do isolamento de *P. insidiosum* do tecido pulmonar, não foi possível explicar. A certeza é de que esse quadro não está relacionado à toxicidade do fármaco, que tem se mostrado seguro (PIGA et al., 2006). Além disso, não houve alterações significativas nas enzimas hepáticas e renais nos coelhos dos diferentes tratamentos. Ibrahim et al. (2011), ao observarem um efeito antagônico na combinação micafungina-deferasirox, já levantaram a necessidade de exploração dos mecanismos envolvidos.

As reações inflamatórias estão associadas com padrões complexos de respostas imunológicas e citotóxicas, desencadeadas pelas células do sistema imune de forma a restringir eventos adversos. Em particular, as concentrações de adenosina aumentam rapidamente nos locais de inflamação, agindo como um freio natural das funções celulares de forma a evitar uma resposta inflamatória hiperérgica seguida de danos aos tecidos (ANTONIOLI et al., 2013). Contudo, tem sido demonstrado que o aumento dos níveis de adenosina na fase aguda do trauma exerce ação protetora por atenuar o edema e a inflamação excessiva, enquanto que elevações crônicas desse nucleosídeo podem ser prejudiciais (VAN LINDEN; ELTZSCHIG, 2007). Nesse contexto, a indução da enzima catabólica ADA representa um importante mecanismo para diminuir os níveis extracelulares de adenosina (ANTONIOLI et al., 2012; BACH et al., 2013).

A ADA exerce um papel fundamental na manutenção do sistema imune, estando distribuída em diversos tecidos, mas especialmente em tecidos com um grande conteúdo de células linfoides (ADAMS; HARKNESS, 1976), nos quais ela contribui para a maturação de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células dendríticas (ANTONIOLI et al., 2012). É também um marcador de ativação de linfócitos T (OKUR et al., 2012). A presença de citocinas Th1, como o IFN- γ , estimula a expressão da ADA em linfócitos, enquanto que a presença de citocinas do tipo Th2, como a IL-4, inibe a expressão da enzima (YONEYAMA et al., 2002).

A hipótese mais provável para o mecanismo que leva à cura pelo uso da imunoterapia na pitiose é que a infecção natural desvia a resposta imune para Th2, enquanto que a imunização ativa uma resposta Th1 (GAASTRA et al., 2010). Corroborando com essa hipótese o estudo de Bach et al. (2013), que demonstraram uma baixa atividade de ADA em linfócitos de coelhos com pitiose experimental, favorecendo o aumento dos níveis de adenosina no meio extracelular e potencializando os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores a fim de preservar

a integridade dos tecidos. Ao contrário, os níveis da ADA aumentaram significativamente nos linfócitos após o tratamento com imunoterápico, levando à desaminação irreversível da adenosina e contribuindo para a resposta imune Th1, com efeitos pró-inflamatórios capazes de diminuir as lesões geradas pela infecção.

Na tentativa de investigar o impacto da quelação de ferro *in situ*, as lesões dos coelhos tratados com placebo, imunoterapia, deferassirox ou imunoterapia e deferassirox foram dissecadas e retiradas após a eutanásia dos animais. Uma parte das amostras foi congelada a -80 °C para determinação da atividade da enzima ADA e parte foi colocada em formol para avaliação histopatológica. Os resultados, apresentados no **Artigo 5**, mostram que houve um aumento significativo na atividade enzimática em todos os grupos tratados. Uma das hipóteses para essa atividade aumentada é o tipo celular presente nas lesões. Através da avaliação histopatológica, observou-se que os grupos tratados apresentaram diminuição significativa de infiltrado eosinofílico, com maior presença de células linfoplasmocitárias e macrófagos. A presença dessas células, além de contribuir para o aumento da atividade da ADA, mostra que houve uma mudança na resposta imune do tipo Th2 para Th1, devidamente reportada na imunoterapia contra pitiose. Curiosamente, o mesmo padrão enzimático e histológico foi observado nos animais tratados com o deferassirox. Os mecanismos pelos quais o deferassirox altera o sistema imune não estão bem definidos. Sabe-se que a sobrecarga de ferro suprime a resposta imune celular, incluindo a produção das citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e IL-12 (MENCACCI et al., 1997). Do mesmo modo, o tratamento com deferassirox em camundongos com estoques de ferro normais, mas infectados por *Rhizopus oryzae*, foi capaz de aumentar os níveis de IFN- γ e TNF quando comparados ao grupo recebendo placebo (IBRAHIM et al., 2007). Dessa forma, acredita-se que apesar da ausência de significância estatística entre o tamanho das lesões do grupo placebo e do grupo tratado com deferassirox, o quelante tenha contribuído para a diminuição no tamanho das lesões através da imunomodulação do sistema imune, mais especificamente, promovendo uma mudança da resposta Th2 para Th1.

Além dos efeitos imunomoduladores do deferassirox em coelhos com pitiose, o **Artigo 5** também demonstrou os efeitos do quelante sobre *P. insidiosum in vitro*. O teste de viabilidade celular com XTT demonstrou que *P. insidiosum* não foi capaz de crescer em meio de cultura líquido na presença de 50 μ g/ml de deferassirox (valor equivalente à CIM da cepa testada). A reversão do efeito inibitório pela

administração de cloreto de ferro ao meio RPMI 1640 indica que o mecanismo de ação do quelante sobre *P. insidiosum* é através da quelação de ferro, que pode estar presente em quantidades mínimas nesse meio de cultura (MINN; BRUMMER; STEVENS, 1997). Além disso, os testes com o corante DiBAC mostraram que o deferasirox causa danos às hifas do oomiceto, promovendo a entrada do corante para o citoplasma e permitindo a visualização do mesmo por microscopia de fluorescência (LEWIS et al., 2011).

Ibrahim comentou a possibilidade da aplicação do deferasirox ao redor das lesões subcutâneas nos coelhos com pitiose (informação pessoal)⁶. Sabe-se que o dano tecidual durante a infecção aumenta os níveis de ferro extracelulares através da liberação de hemoproteínas, ferritina e do próprio ferro que estão no interior das células (SKAAR, 2010). Dessa forma, a aplicação local teria por objetivos evitar a disseminação da doença e concentrar o medicamento no local de ação. Leal et al. (2013) demonstraram que a aplicação local tópica de quelantes de ferro foi eficaz na inibição do crescimento de *A. fumigatus* e *F. oxysporum* e prevenção da doença de córnea causada por esses fungos. Os autores também sugerem que com a aplicação local os efeitos colaterais sistêmicos são praticamente inexistentes.

Atenção considerável tem sido dispensada no desenvolvimento de fármacos com função de sideróforos, de forma que os transportadores de sideróforos sejam utilizados como “cavalos de Troia” (CAZA; KRONSTAD, 2013). Portanto, um entendimento dos mecanismos de obtenção de ferro dos micro-organismos é crucial para facilitar a implantação desses novos medicamentos. Um campo de estudo completamente inexplorado no caso do oomiceto *P. insidiosum*.

Além da ausência do sequenciamento genômico completo de *P. insidiosum*, um dos grandes entraves para o avanço das pesquisas com este oomiceto é a dificuldade de se reproduzir a doença em modelos experimentais. Tanto é verdadeiro esse fato que até hoje não se sabe por que o coelho é o único animal susceptível à doença, embora não haja relatos da infecção natural nessa espécie (GAASTRA et al., 2010). Nesse sentido, o **Artigo 3** teve por objetivo reproduzir experimentalmente a pitiose na mosca-das-frutas *D. melanogaster*. O estudo demonstrou que as moscas geneticamente normais são resistentes à infecção. Contudo, moscas deficientes de Toll tiveram entre 20 e 30% de mortalidade,

⁶ IBRAHIM, A. S. Informação recebida no 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Berlim, Alemanha, em junho de 2012.

salientando a importância desses receptores na infecção por *P. insidiosum*. Os receptores do tipo Toll são fundamentais nas infecções fúngicas, desde as mais superficiais como as mucocutâneas até as mais invasivas que oferecem risco à vida do paciente, devido à habilidade em controlar os processos inflamatórios e anti-inflamatórios através do reconhecimento dos PAMPs (BOURGEOIS; KUCHLER, 2012). Por exemplo, o receptor Toll-2 reconhece as β -glucanas de diversas espécies fúngicas. Além disso, os receptores Toll são responsáveis por mediar o desenvolvimento da resposta imune Th1. Por exemplo, no caso da infecção aérea por *Aspergillus* spp., os receptores Toll são requeridos para a diferenciação de células T CD4+ em células produtoras de IFN- γ nos pulmões (RIVERA et al., 2006). Dessa forma, os resultados encontrados corroboram com Mendoza e Newton (2005), que mencionaram que humanos e animais susceptíveis à pitiose poderiam exibir defeitos em genes relacionados aos receptores-chave da imunidade.

Surpreendentemente, moscas normais não se tornaram susceptíveis à infecção por *P. insidiosum* após a sobrecarga de ferro, bem como não se observou aumento da mortalidade nas moscas deficientes em Toll com sobrecarga de ferro. Duas hipóteses podem explicar esses resultados. Primeiro, pode-se implicar que o ferro não tem papel na virulência, ao menos nesse modelo experimental. Segundo, a baixa virulência desse oomiceto nas moscas, principalmente devido à dificuldade da concentração do inóculo, pode ter mascarado os resultados. Esse é apenas o segundo modelo para estudo da pitiose que se conhece. Apesar dos resultados terem sido promissores, mais estudos são necessários para esclarecer as razões que levam à ocorrência da pitiose em humanos e animais.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse estudo, pode-se concluir que:

- A infecção por *P. insidiosum* promove anemia microcítica hipocrômica em coelhos infectados experimentalmente. A alta correlação positiva entre a CTLF e o tamanho das lesões, associada à diminuição dos depósitos de ferro hepático indicam que a origem da anemia é por privação de ferro;
- A terapia farmacológica utilizando o quelante de ferro deferasirox não parece ser uma boa opção para o tratamento da pitiose. Primeiro porque as cepas de *P. insidiosum* se mostraram pouco susceptíveis ao fármaco *in vitro*. Além disso, apesar da leve diminuição do tamanho das lesões e da melhora de alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos *in vivo*, a disseminação da doença nos animais é um fator que deve ser considerado previamente ao uso desse quelante para o tratamento da doença; fica a perspectiva de novos estudos para elucidar o porquê da disseminação pulmonar de *P. insidiosum*;
- As altas CIMs e CEMs da equinocandina micafungina indicam que *P. insidiosum* é pouco susceptível a esse inibidor de β -glucanas da parede celular. Contudo, houve sinergismo na maioria dos isolados quando esse fármaco foi utilizado em combinação com o deferasirox, atingindo CIMs menores do que os picos plasmáticos dos fármacos. *In vivo*, a combinação dos fármacos também foi responsável pelas menores curvas de crescimento das lesões. Este é um ponto a ser considerado futuramente, devendo-se avaliar novas formas de administração do quelante de ferro na tentativa de minimizar a disseminação pulmonar da doença observada em alguns coelhos;
- O mecanismo de ação de deferasirox contra *P. insidiosum in vitro* é através da quelação de ferro. Nas lesões foi possível observar que o deferasirox agiu de forma similar à imunoterapia, aumentando a atividade da enzima ADA e promovendo alteração das células

inflamatórias consistente com uma mudança da resposta Th2 para Th1.

- A mosca-das-frutas *D. melanogaster* deficiente de Toll foi susceptível à infecção por zoósporos de *P. insidiosum*, ao contrário das *D. melanogaster* geneticamente normais, que foram resistentes. A sobrecarga de ferro não aumentou a virulência de *P. insidiosum* nesse modelo experimental.

REFERÊNCIAS

ABE, F. et al. Effects of iron and desferrioxamine on *Rhizopus* infection. **Mycopathologia**. v. 110, n. 2, p. 87-91, 1990.

ADAMS, A.; HARKNESS, R. A. Adenosine deaminase activity in thymus and humans tissues. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 26, n. 3, p. 647-649, 1976.

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.

ALENCAR, N. X. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 5, n. 2, p. 196-205, 2002.

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

ALMEIDA, R. S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**. v. 9, n. 7, p. 1000-1012, 2009.

ALMIRÓN, M. et al. Ferrochelataze is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 10, p. 6225-6230, 2001.

ALTES, A. et al. Frequent severe liver iron overload after stem cell transplantation and its possible association with invasive aspergillosis. **Bone Marrow Transplant**. v. 34, n. 6, p. 505-509, 2004.

ÁLVAREZ, J. C.; GARCÍA, L. R.; GARAY, O. V. Pythiosis cutánea equina en Córdoba, Colombia. Reporte de cinco casos. **Revista Científica, FCV-LUZ**. v. XX, p. 590-594, 2010.

ÁLVAREZ, J. A. C.; VILORIA, M. I. V.; AYOLA, S. C. P. Evaluación clínica e histopatológica de la pitiosis cutánea en burros (*Equus asinus*). **Revista de Medicina Veterinaria**. v. 0, n. 25, p. 9-19, 2013.

ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. **The New England Journal of Medicine**. v. 341, n. 26, p. 1986-1995, 1999.

ANTACHOPOULOS, C. et al. Concentration-dependent effects of caspofungin on the metabolic activity of *Aspergillus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 3, p. 881-887, 2007.

ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Current Drug Targets**. v. 13, n. 6, p. 842-862, 2013.

ARGENTA, J. S. et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 2, p. 767-769, 2008.

_____. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**. v. 157, n. 1-2, p. 137-142, 2012.

ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1832, n. 9, p. 1378-1383, 2013.

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**. v. 159, n. 1-2, p. 141-148, 2012.

BACH, B. C. et al. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 64, n. 10, p. 718-722, 2010.

_____. E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. **Cell Biochemistry and Function**. v. 31, n. 6, p. 476-481, 2013.

BARRY, M. Liver iron concentration, stainable iron, and total body storage iron. **Gut**. v. 15, n. 5, p. 411-415, 1974.

BASSI, R. M. A.; CUNHA, M. C. I.; COSCARÓN, S. Estudo do comportamento de tabanídeos (Díptera, *Tabanidae*) do Brasil. **Acata Biológica Paranaense**. v. 29, n. 1-4, p. 101-115, 2000.

BERENBAUM, M. C. What is synergy? **Pharmacological Reviews**. v. 41, n. 2, p. 93-141, 1989.

BIANCHI, M. V. **Dermatopatias diagnosticadas em equinos no setor de patologia veterinária da UFRGS de 2000 a 2013**. 2013. 24 f. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BISSONNETTE, K. W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 29, n. 1, p. 39-44, 1991.

BLATZER, M.; BINDER, U.; HAAS, H. The metalloreductase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation. **Fungal Genetics and Biology**. v. 48, n. 11, p. 1027-1033, 2011.

BOABAID, F. M. et al. Conidiobolomicose em ovinos no estado de Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 77-81, 2008.

BOELAERT, J. R. et al. Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. *In vitro* and *in vivo* animal studies. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 91, n. 5, p. 1979-1986, 1993.

BOSCO, S. M. G. et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 5, p. 715-717, 2005.

_____. Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. **Medical Mycology**. v. 46, n. 6, p. 557-565, 2008.

BOTTON, S. A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**. v. 62, n. 4, p. 1225-1229, 2011.

BOURGEOIS, C.; KUCHLER, K. Fungal pathogens-a sweet and sour treat for toll-like receptors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 22, n. 2, p.142, 2012.

BRODERICK, N. A.; WELCHMAN, D. P.; LEMAITRE, B. Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In: ROLFF, J; REYNOLDS, S. E. (Ed.). **Insect**

infection and immunity: Evolution, ecology, and mechanisms. New York: Oxford. 2009. p. 13-33.

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

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

CACHESYN INC. Copyright 2010. Disponível em: <<http://www.cachesyn.com>>. Acesso em: 18 dez. 2013.

CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 10, p. 3710-3713, 2011.

CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 16, n. 6, p. 567-571, 2004.

CAPPELLINI, M. D. et al. A Phase III study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3455-62, 2006.

CAPELLINI, M. D. Exjade® (deferasirox, ICL670) in the treatment of chronic iron overload associated with blood transfusion. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v. 3, n. 2, p. 291-299, 2007.

CARRERA, M. V. et al. Pitiose em ovinos nos estados de Pernambuco e Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 4, p. 476-482, 2013.

CARVALHO, E. C. Q.; LEMOS, L. S.; REIS Jr., J. L. **Pitiose eqüina: o popular formigueiro da Baixada Campista**. Boletim Técnico UENF. 2000. 48 p.

CAVALHEIRO, A. S. et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**. v. 137, n. 3-4, p. 408-411, 2009.

CAZA, M.; KRONSTAD, J. W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 3, p. 80, 2013.

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.

CHAMILOS, G. et al. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 193, n. 7, p. 1014-1022, 2006.

_____. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. **PNAS**. v. 105, n. 27, p. 9367-9372, 2008.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 76, n. 1, p. 42-45, 2013.

CRICHTON, R. R. **Inorganic biochemistry of iron metabolism**: from molecular mechanisms to clinical consequences. 2 ed. Chichester: Wiley, 2001.

DAVIS, D. J. et al. Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. **Mycological Research**. v. 110, n. Pt 1, p. 96-103, 2006.

DE HAAN, J.; HOOGKAMER, L. J. Hypho-mycosis destruens. **Veeartsennijkundige Bladen voor Nederlandsch-Indie**. v. 13, p. 350-374, 1901.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**. v. 362, n. 9390, p. 1142-1151, 2003.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**. v. 36, n. 11, p. 1445-1457, 2003.

DICK, M. W. **Straminipilous fungi**: Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protist, the plasmodiophorids and similar organisms. London: Kluwer Academic Publishers, 2001, p. 67.

DIOMEDI, A. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Revista Chilena de Infectología**. v. 21, n. 2, p. 89-101, 2004.

DONNELLY, J. P.; LAHAV, M. Deferasirox as adjunctive therapy for mucormycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, n. 3, p. 519-520, 2012.

DÓRIA, R. G. S. et al. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of amphotericin B. **Veterinary Surgery**. v. 41, n. 6, p. 759-765, 2012.

DYKSTRA, M. J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**. v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.

ELEFANTI, A. et al. Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against *Aspergillus* species in the presence of serum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, n. 4, p. 1625-1631, 2013a.

_____. Amphotericin B- and voriconazole-echinocandin combinations against *Aspergillus* spp.: Effect of serum on inhibitory and fungicidal interactions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, n. 10, p. 4656-4663, 2013b.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 55, n. 6, 333-339, 2001.

ESPINEL-INGROFF, A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991). **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 403-409, 2003.

EVANS, S. E. et al. *Toll*-deficient *Drosophila* are resistant to infection by *Pneumocystis* spp.: additional evidence of specificity to mammalian hosts. **Virulence**. v.1, n. 6, p. 523-525, 2010.

FALLON, J. P.; TROY, N.; KAVANAGH, K. P. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. **Virulence**. v. 2, n. 5, p. 413-421, 2011.

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

FIGHERA, R. A. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria: o autor, 2001. 214 p.

FISCHER, J. R. et al. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 6, n. 3, p. 380-382, 1994.

FOIL, C. S. O. et al. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium spp.* **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 20, p. 959-966, 1984.

FOSTER, L. A. Utilization and cell-surface binding of hemin by *Histoplasma capsulatum*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 48, n. 5, p. 437-442, 2002.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**. v. 146, n. 1-2, 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.

GANZ, T.; NEMETH, E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. **The Annual Review of Medicine**. v. 62, p. 347-360, 2011.

GLITTENBERG, M. T. et al. Wild-type *Drosophila melanogaster* as an alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*. **Disease Models & Mechanisms**. v. 4, n. 4, p. 504-514, 2011.

GRECCO, F. B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 11, p. 938-942, 2009.

GROLL, A. H. et al. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal echinocandin lipopeptide micafungin (FK463) in rabbits. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 12, p. 3322-3327, 2001.

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

GROOTERS, A. M. et al. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 14, n. 4, p. 288-294, 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.

GROTTO, H. Z. W. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32, n. 2, p. 22-28, 2010.

GUMBO, T. et al. Once-weekly micafungin therapy is as effective as daily therapy for disseminated candidiasis in mice with persistent neutropenia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 3, p. 968-974, 2007.

HAMMACOTT, J. E.; WILLIAMS, P.H.; CASHMORE, A. M. *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* fre1 mutant. **Microbiology**. v. 146 n. Pt 4, p. 869-876, 2000.

HARVEY, J. W. et al. Serum ferritin, serum iron, and erythrocyte value in foals. **American Journal of Veterinary Research**. v. 48, n. 9, p. 1348-1352, 1987.

HENDRIX, J. W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**. v. 144, n. 3621, p. 1028-1029, 1964.

HEYMANN, P. et al. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. **Infection and Immunity**. v. 70, n. 9, p. 5246-5255, 2002.

HISSEN, A. H. T. et al. Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. **Infection and Immunity**. v. 72, n. 3, p. 1402-1408, 2004.

HOFFMANN, J. A. et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**. v. 284, n. 5418, p. 1313-1318, 1999.

HOPE, W. W. et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of micafungin in experimental hematogenous *Candida* meningoencephalitis: implications for echinocandin therapy in neonates. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 197, n. 1, p. 163-171, 2008.

HOWARD, D. H. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 3, p. 394-404, 1999.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006 (Resultados Preliminares)**. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. 142 p.

IBRAHIM, A. S., et al. Deferiprone iron chelation as a novel therapy for experimental mucormycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, n. 5, p. 1070-1073, 2006.

_____. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. **Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 9, p. 2649-2657, 2007.

_____. The iron chelator deferasirox enhances liposomal amphotericin B efficacy in treating murine invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65, n. 2, p. 289-292, 2010.

_____. Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron chelation, polyenes, and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 4, p. 1768-1770, 2011.

IC HITANI, T.; AMEMIYA, J. *Pythium gracile* isolated from the foci of granular dermatitis in the horse (*Equus caballus*). **Transactions of Mycology Society of Japan**. v. 21, n. 2, p. 263-265, 1980.

IKEDA, F. et al. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 3, p. 614-618, 2000.

IMWIDHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**. v. 70, n. 826, p. 558-560, 1994.

_____. Mycotic keratitis in Thailand. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 33, n. 1, p. 81-82, 1995.

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, C. H. et al. *Histoplasma capsulatum* and *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode model for an innate immune response to fungal infection. **Medical Mycology**. v. 47, n. 8, p. 808-813, 2009.
- JOHNSON, E. E.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. **Microbes and Infection**. v. 14, n. 3, p. 207-216, 2012.
- JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. **Cell Microbiology**. v. 10, n. 2, p. 277-284, 2008.
- JURADO, R. L. Iron, infections, and anemia of inflammation. **Clinical Infectious Diseases**. v. 25, n. 4, p. 888-895, 1997.
- KAUFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**. v. 143, n. 1, p. 3-7, 1998.
- KEERATIJARUT, A. et al. A peptide ELISA to detect antibodies against *Pythium insidiosum* based on predicted antigenic determinants of exo-1,3-b-glucanase. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v. 44, n. 4, p. 672-680, 2013.
- KEIRNS, J. et al. Steady-state pharmacokinetics of micafungin and voriconazole after separate and concomitant dosing in healthy adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 2, p. 787-790, 2007.
- KIEHN, T. E. *Pythium insidiosum* reidentified as *Gymnascella hyalinospora*. **Clinical Infectious Diseases**. v. 36, n. 10, p. 1350-1351, 2003.
- KNIGHT, S. A. et al. Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. **Microbiology**. v. 148, n. Pt. 1, p. 29-40, 2002.
- _____. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. **Infection and Immunity**. v. 73, n. 9, p. 5482-5492, 2005.
- KOLNAGOU, A.; KLEANTHOUS, M.; KONTOGHIORGHES, G. J. Reduction of iron stores to normal range levels in thalassaemia by using a deferiprone/deferoxamine

combination and their maintenance thereafter by deferiprone monotherapy. **European Journal of Haematology**. v. 85, n. 5, p. 430-438, 2010.

KONTOGHIORGHES, G. J. et al. Transfusional iron overload and chelation therapy with deferoxamine and deferiprone (L1). **Transfusion Science**. v. 23, n. 3, p. 211-223, 2000.

_____. The role of iron and chelators on infections in iron overload and non iron loaded conditions: prospects for the design of new antimicrobial therapies. **Hemoglobin**. v. 34, n. 3, p. 227-239, 2010.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Increased bone marrow iron stores is an independent risk factor for invasive aspergillosis in patients with high-risk hematologic malignancies and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Cancer**. v. 110, n. 6, p. 1303-1306, 2007.

KRAJAEJUN, T. et al. Identification of a novel 74-kiloDalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 5, p. 1674-1680, 2006a.

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

_____. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 16, n. 4, p. 506-509, 2009.

_____. Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Fungal Biology**. v. 115, n. 7, p. 683-696, 2011.

KROCKENBERGER, M. B. et al. Sequential opportunistic infections in two German Shepherd dogs. **Australian Veterinary Journal**. v. 89, n. 1-2, p. 9-14, 2011.

LAMARIS, G. A. et al. Virulence studies of *Scedosporium* and *Fusarium* species in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 196, n. 12, p. 1860-1864, 2007.

LABBE-BOIS, R.; CAMADRO, J. M. Ferrochelataze in *Saccharomyces cerevisiae*. In: WINKELMANN, G.; WINGE, D. R. (Ed.). Metal ions in fungi. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 413-453.

LAMBERT, C. C.; HUNTER, R. L. Low levels of unsaturated transferrin as a predictor of survival in pneumococcal pneumonia. **Annals of Clinical and Laboratory Science**. v. 20, n. 2, p. 140-146, 1990.

LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. **Vascular**. v. 17, n. 4, p. 234-238, 2009.

LEAL, A. B. M. et al. Pitiose equina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 21, n. 4, p. 151-156, 2001.

LEAL, A. T. et al. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum* antigens. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 15, n. 2, p. 63-68, 2005.

LEAL, S. M. et al. Targeting iron acquisition blocks infection with the fungal pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. **PLOS Pathogens**. v. 9, n. 7, p. e1003436, 2013.

LEMAITRE, B. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**. v. 86, n. 6, p. 973-983, 1996.

LEMAITRE, B.; REICHHART, J.; HOFFMANN, J. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94, n. 26, p. 14614-14619, 1997.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**. v. 25, n. 1, p. 697-743, 2007.

LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 51, n. 3, p. 513-521, 2003.

LÉVESQUE, C. A.; DE COCK, A. W. A. M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**. v. 108, n. 12, p. 1363-1383, 2004.

LEWIS, R. E. et al. Activity of deferasirox in *Mucorales*: Influences of species and exogenous iron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 1, p. 411-413, 2011.

LIONAKIS, M. S. et al. Toll-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 191, n. 7, p. 1188-1195, 2005.

LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: New tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**. v. 2, n. 6, p. 521-527, 2011.

LIONAKIS, M. S.; KONTOYIANNIS, D. P. *Drosophila melanogaster* as a model organism for invasive aspergillosis. In: BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M. (Ed.). **Host-fungus interactions: Methods and protocols, methods in molecular biology**. New York: Humana press, 2012. cap. 32, p. 455-468.

LORETO, É. S. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 7, p. 3588-3590, 2011.

_____. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 1-2, p. 222-226, 2012.

MACDONALD, E. et al. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology**. v. 37, n. 3, p. 245-249, 2002.

MACHADO, A. A.; IZUMI, C.; FREITAS, O. Bases moleculares da absorção do ferro. **Alimentos e Nutrição**. v. 16, n. 3, p. 293-298, 2005.

MACHADO, L. P. et al. Metabolismo do ferro em equinos atletas. **Ciência Rural**. v. 40, n. 3, p. 703-711, 2010.

MAHL, D. L. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 4021-4023, 2012.

MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**. v. 62, n. 11, p. 5154-5156, 1994.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 9, p. 865-868, 2012.

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.

MATSUMOTO, S. Y. et al. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of pulmonary aspergillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 3, p. 619-621, 2000.

MCDONALD, C. J. et al. Increased iron stores correlate with worse disease outcomes in a mouse model of schistosomiasis infection. **PLoS One**. v. 5, n. 3, p. e9594, 2010.

MCLAUGHLIN, B. G.; AYER, A. A. et al. Gastrointestinal pythiosis in a dog from Kentucky. **Canine Practice**. v. 20, n. 6, p. 17-19, 1995.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**. v. 296, n. 5566, p. 298-300, 2002.

MENCACCI, A. et al. Iron overload alters innate and T helper cell responses to *Candida albicans* in mice. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 175, n. 6, p. 1467-1476, 1997.

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

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

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

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

MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosus in horses. **Mycopathologia**. v. 119, n. 2, p. 89-95, 1992.

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

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

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

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. *Pythium insidiosum*. In: MERZ, W. G.; HAY, R. J. (Ed.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. 10. ed. London: ASM Press, 2005. p. 617-630.

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

MENDOZA, L.; VILELA, R. What is your diagnosis? *Pythium insidiosum* or *Lagenidium* sp.? **Veterinary Clinical Pathology**. v. 38, n. 3, p. 273, 2009.

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**. v. 7, n. 3, p. 198-208, 2013.

MIKULSKA, M.; VISCOLI, C. Current role of echinocandins in the management of invasive aspergillosis. **Current Infectious Disease Reports**. v. 13, n. 6, p. 517-527, 2011.

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

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, n. 6, p. 221-226, 1982.

_____. Haematology of horses with phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 60, n. 1, p. 28-29, 1983.

_____. The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. **Veterinary Pathology**. v. 21, n. 3, p. 325-332, 1984.

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

MINN, Y.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Effect of iron on fluconazole activity against *Candida albicans* in presence of human serum or monocyte-derived macrophages. **Mycopathologia**. v 138, n. 1, p. 29-35, 1997.

MISSIRLIS, F. et al. Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of *Drosophila* ferritin. **Genetics**. v. 177, n. 1, p. 89-100, 2007.

MOLECULAR MEDICINE[®]. Copyright, Daniele Focosi 2001-2013. Disponível em: <<http://www.mm.interhealth.info>>. Acesso em: 18 dez. 2013.

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

MOORE-LANDECKER, J. Zoosporic fungi. In: _____. **Fundamentals of the fungi**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Cap. 3, p. 33-79.

MORAES, A. S. et al. **Impactos econômicos, sociais e ambientais de tecnologias da Embrapa Pantanal: 2. Pitium-Vac[®] - imunoterápico contra pitiose equina**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2013. 37 p. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC123.pdf>>. Acesso em acesso em 22 Abr. 2013.

MOSBAH, E. et al. Diagnosis and surgical management of pythiosis in draft horses: report of 33 cases in Egypt. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 32, n. 3, p. 164-169, 2012.

MYLONAKIS, E. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 24, p. 15675-15680, 2002.

NETO, R. T. et al. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. **Veterinary Dermatology**. v. 21, n. 2, p. 202-204, 2009.

NEVES, J. V.; WILSON, J. M.; RODRIGUES, P. N. S. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. **Development and Comparative Immunology**. v. 33, n. 7, p. 848-857, 2009.

NEVITT, T. War-Fe-re: iron at the core of fungal virulence and host immunity. **Biometals**. v. 24, n. 3, p. 547-558, 2011.

NIWA, T. et al. Tissue distribution after intravenous dosing of micafungin, an antifungal drug, to rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 27, n. 7, p. 1154-1156, 2004.

NIWA, T.; SHIRAGA, T.; TAKAGI, A. Drug-drug interaction of antifungal drugs. **Yakugaku Zasshi**. v. 125, n. 10, p. 795-805, 2005.

NYAKERIGA, A. M. et al. Iron deficiency and malaria among children living on the coast of Kenya. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 190, n. 3, p. 439-447, 2004.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**. v. 81, n. 11, p. 2844-2853, 1993.

ORINO, K; WATANABE, K. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. **The Veterinary Journal**. v. 178, n. 2, p. 191-201, 2008.

OKUR, E. et al. Malondialdehyde level and adenosine deaminase activity in adenoid tissue of patients with OME and obstructive adenoid hypertrophy. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**. v. 76, n. 4, p. 579-582, 2012.

OZMENT, C. P.; TURI, J. L. Iron overload following red blood cell transfusion and its impact on disease severity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1790, n. 7, p. 694-701, 2009.

PAIVA, A. A.; RONDÓ, P. H. C.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Revista de Saúde Pública**. v. 34, n. 4, p. 421-426, 2000.

PARK, J. W.; LEE, B. L. Insect Immunology. In: GILBERT, L. I. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. Oxford: Elsevier, 2012. p. 480-512.

PASTOR, F. J.; GUARRO, J. Micafungina en el tratamiento de la infección fúngica en modelos animales. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 26, n. 1, p. 42-48, 2009.

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, n. 5, p. 1168-1171, 2007.

_____. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**. v. 38, n. 1, p. 143-147, 2008a.

_____. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 18, n. 3, p. 129-133, 2008b.

_____. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**. v. 176, n. 3-4, p. 309-315, 2013.

PESAVENTO, P. A. et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white faced ibis. **Veterinary Pathology**. v. 45, n. 4, p. 538-541, 2008.

PESSOA, C. R. M. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 24, n. 6, p. 1133-1136, 2012.

PETRAITIS, V. R. et al. Comparative antifungal activities and plasma pharmacokinetics of micafungin (FK463) against disseminated candidiasis and invasive pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 6, p. 1857-1869, 2002.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 30, n. 2, p. 108-117, 2007.

- PÉREZ, R. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**. v. 109, n. 1-2, p. 121-128, 2005.
- PIEREZAN, F. et al. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 equinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 29, n. 3, p. 275-280, 2009.
- PIGA, A. et al. Randomized phase II trial of deferasirox (Exjade, ICL670), a once-daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in thalassemia patients with transfusional iron overload. **Haematologica**. v. 91, n. 7, p. 873-880, 2006.
- PORTELA, R. A. et al. Doenças da cavidade nasal em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 10, p. 844-854, 2010.
- POTRYKUS, J. et al. Fungal iron availability during deep seated candidiasis is defined by a complex interplay involving systemic and local events. **PLOS Pathogens**. v. 9, n. 10, p. e1003676, 2013.
- PRASERTWITAYAKIJ, N. et al. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v. 33, n. 3, p. 204-214, 2003.
- PUKKILA-WORLEY, R. et al. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **Eukaryotic Cell**. v. 8, n. 11, p. 1750-1758, 2009.
- PURCELL, K. L. et al. Jejunal obstruction caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 205, n. 2, p. 337-339, 1994.
- RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 17, n. 3, p. 262-269, 2005.
- RAVISHANKAR, J. P. et al. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 34, n. 3, p. 161-175, 2001.
- REED, C. et al. Deferasirox, an iron-chelating agent, as salvage therapy for rhinocerebral mucormycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 11, p. 3968-3969, 2006.

REINPRAYOON, U. et al. *Lagenidium* sp. ocular infection mimicking ocular pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 8, p. 2778-2780, 2013.

REIS JR, J. L. et al. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**. v. 96, n. 3, p. 289-295, 2003.

RIET-CORREA, F. et al. Outbreaks of rhinofacial and rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraíba, northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 29-35, 2008.

RIVELLA, S. Ineffective erythropoiesis and thalassemias. **Current Opinion in Hematology**. v. 16, n. 3, p. 187-194, 2009.

RIVERA, A. et al. Innate immune activation and CD4+ T cell priming during respiratory fungal infection. **Immunity**. v. 25, n. 4, p. 665-675, 2006.

RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.

RODRIGUES, A. et al. Intestinal dog pythiosis in Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 16, n. 1, p. 37-41, 2006.

SAIKIA, S. et al. Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**. 2013. In press. doi: 10.1128/IAI.01357-13.

SALIPANTE, S. J. et al. Molecular diagnosis of subcutaneous *Pythium insidiosum* infection by use of PCR screening and DNA sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 4, p. 1480-1483, 2012.

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

SANGRUCHI, T. et al. The pathological study of amputated limbs infected by *Pythium insidiosum*: to propose adequacy of surgical margins. **Siriraj Medical Journal**. v. 65, n. 1, p. 1-5, 2013.

SANTOS, C. E. P. et al. Pitiose cutânea em equinos: diagnóstico diferencial. **Revista Brasileira de Medicina Equina**. v. 32, p. 24-27, 2010.

_____. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 18, n. 8, p. 1397-1399, 2011a.

_____. Eficácia da imunoterapia no tratamento de pitiose facial em equino. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39, n. 1, p. 955-2011b.

_____. Pitiose em animais de produção no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 12, p. 1083-1089, 2011c.

SANTOS, C. E. P. **A pitiose em equídeos e bovinos no Pantanal Matogrossense**. 2012. 131 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

SANTOS, C. E. P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian pantanal and nearby areas: results of 76 cases. **Journal of Equine Veterinary Science**. 2013. In press. doi: 10.1016/j.jevs.2013.06.003.

SANTOS, M. N.; LONDERO, A. T. Zigomicose subcutânea em cavalos. **Pesquisas Agropecuárias Brasileiras – Série Veterinária**. v. 9, n. 7, p. 7-8, 1974.

SANTOS, S. A. **Recomendações sobre manejo nutricional para equinos criados em pastagens nativas no Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA – CPAP, 1997. 63 p.

SANTURIO, J. M., et al. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**. v. 141, n. 3, 123-125, 1998.

SANTURIO, J. M.; LEAL, A. T.; MONTEIRO, A. B. Pythiose. In: LEFÉVRE, P. C.; BLANCOU, J.; CHERMETTE, R. (Ed.). **Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires de Bétail**. 1. ed. Paris: Lavoisier, 2003. p. 1231-1241.

SANTURIO, J. M., et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated. **Vaccine**. v. 21, n. 19-20, p. 2535-2540, 2003.

_____. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006a.

_____. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

_____. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**. v. 163, n. 9, p. 276-277, 2008.

SATHAPATAYAYONGS, B. et al. Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Iron and microbial infection. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, n. 12, p. 946-953, 2004.

SCHLOEMER, N. J. et al. Fatal disseminated *Pythium insidiosum* infection in a child with Diamond-Blackfan anemia. **Infectious Diseases in Clinical Practice**. v. 21, n. 4, p. e24-e26, 2013.

SCHRETTL, M. et al. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 200, n. 9, p. 1213-1219, 2004.

_____. Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. **PLoS Pathogens**. v. 3, n. 9, p. 1195-1207, 2007.

SCHRETTL, M.; HASS, H. Iron homeostasis—Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? **Current Opinion in Microbiology**. v. 14, n. 4, p. 400-405, 2011.

SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia**. v. 95, n. 2, p. 200-208, 2003.

_____. Development of a species specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 6, p. 2411-2418, 2004.

SCOTT, L. J. Micafungin: a review of its use in the prophylaxis and treatment of invasive *Candida* infections. **Drugs**. v. 72, n. 16, p. 2141-2165, 2012.

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, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

SHIPTON, W. A. *Pythium destruens* sp. nov., an agent of equine pythiosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 25, n. 3, p. 137-151, 1987.

SKAAR, E. P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. **PLoS Pathogens**. v. 6, n.8, p. e1000949, 2010.

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

SMITH, J. E. et al. Iron deficiency and pseudo-iron deficiency in hospitalized horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 188, n. 3, p. 285-287, 1986.

SMITH, J. E. Iron metabolism and its diseases. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. New York: Academic Press, 1997, p. 223-240.

SOUZA, T. M. et al. Prevalência dos tumores cutâneos de equinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 5, p. 379-382, 2011.

SPELLBERG, B.; IBRAHIM, A. S. Recent advances in the treatment of Mucormycosis. **Current Infectious Disease Reports**. v. 12, n. 6, p. 423-429, 2010.

SPELLBERG, B., et al. The Deferasirox–AmBisome therapy for Mucormycosis (DEFEAT Mucor) study: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, n. 3, p. 715-722, 2012.

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

SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**. v. 46, n. 1, p. 41-52, 2008.

SUTCLIFFE, M. C.; SAVAGE, A. M.; ALFORD, R. H. Transferrin-dependent growth inhibition of yeast-phase *Histoplasma capsulatum* by human serum and lymph. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 142, n. 2, p. 209-219, 1980.

TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**. v. 41, n. 4, 412-415, 2004.

TANGEN, K. L. et al. The iron- and cAMP-regulated gene *SIT1* influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**. v. 153, n. Pt-1, p. 29-41, 2007.

TAKAZONO, T. et al. Efficacy of combination antifungal therapy with intraperitoneally administered micafungin and aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary aspergillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 8, p. 3508-3510, 2009.

TAWARA, S. et al. *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 1, p. 57-62, 2000.

THIANPRASIT, M. Fungal infection in Thailand. **Japanese Journal of Dermatology**. v. 96, p. 1343-1345, 1986.

THIANPRASIT, M.; CHAIPRASERT, A.; IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis. **Current Topics in Medical Mycology**. v. 7, n. 1, p. 43-54, 1996.

THIEMAN, K. M. et al. Diagnosis and treatment of truncal cutaneous pythiosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 239, n. 9, p. 1232-1235, 2011.

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, n. 6, 1394-1400, 1998.

THOMAS, R.; LEWIS, D. Pythiosis. **Selecciones Veterinarias**. v. 8, n. 3, p. 313-319, 1998.

THONGSRI, Y. et al. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* using a single-tube Nested PCR. **Mycopathologia**. v. 176, n. 5-6, p. 369-376, 2013.

THORNTON, C. R.; WILLS, O. E. Immunodetection of fungal and oomycete pathogens: Established and emerging threats to human health, animal welfare and global food security. **Critical Reviews in Microbiology**. 2013. In press. doi:10.3109/1040841X.2013.788995.

- TOMISHIMA, M. et al. FK463, a novel water-soluble echinocandin lipopeptide: synthesis and antifungal activity. **The Journal of Antibiotics**. v. 52, n. 7, p. 674-676, 1999.
- TONDOLO, J. S. et al. A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 93, n. 1, p. 52-54, 2013.
- TRISCOTT, J. A.; WEEDOM, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.
- TROST, M. E. et al. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrointestinal canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 8, p. 673-679, 2009.
- UBIALI, D. G. et al. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**. v. 149, n. 2-3, p. 137-145, 2013.
- VAN CUTSEM, J.; BOELAERT, J. R. Effects of deferoxamine, feroxamine and iron on experimental mucormycosis (zygomycosis). **Kidney International**. v. 36, n. 6, p. 1061-1068, 1989.
- VAN LINDEN, A.; ELTZSCHIG, H. K. Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. **Expert Opinion on Biological Therapy**. v. 7, n. 9, p. 1437-1447, 2007.
- VANITTANAKOM, N. et al. Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. **International Journal of Medical Microbiology**. 2013. In press. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.016.
- VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**. v. 50, n. 2, p. 219-224, 2012.
- WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**. v. 22, n. 27-28, p. 3613-3621, 2004.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of chronic disease. **The New England Journal of Medicine**. v. 352, n. 10, p. 1011-1023, 2005.

WEISS, H. M. et al. *In vitro* blood distribution and plasma protein binding of the iron chelator deferasirox (ICL670) and its iron complex Fe-[ICL670]₂ for rat, marmoset, rabbit, mouse, dog, and human. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 34, n. 6, p. 971-975, 2006.

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

WESSLING-RESNICK, M. Iron homeostasis and the inflammatory response. **Annual Review of Nutrition**. v. 30, p. 105-122, 2010.

WHITE, S. D. et al. Cutaneous pythiosis in a nontravelled California horse. **Veterinary Dermatology**. v. 19, n. 6, p. 391-394, 2008.

WITKAMP, J. Bijdrage tot de kennis van de *Hyphomycosis destruens*. **Nederlandsch-Indische Bladen voor Diergeneeskunde en Dierenteelt**. v. 36, 229-245, 1924.

YONEYAMA, Y. et al. Relation between adenosine deaminase activities and cytokine-producing T cells in women with preeclampsia. **Clinical Biochemistry**. v. 35, n. 4, p. 303-306, 2002.

ZANETTE, R. A. et al. Enzymatic variability among Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 30, n. 4, p. 264-266, 2013.

ZHANG, Z. T.; ZHU, S. Y. Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila*. **Insect Molecular Biology**. v. 18, n. 5, p. 549-556, 2009.

ANEXOS



Anexo A – Carta de aprovação do comitê de ética



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ INTERNO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "O papel do íon ferro nas infecções por *Pythium insidiosum* "

Numero do Parecer: 72/2010

Pesquisador Responsável: Janio Moraes 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 CIETEA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 25/11/2010

Santa Maria, 25 de novembro de 2010.

Maria Lizandra do Rêgo Leal
Coordenador do Comitê Interno de Ética em Experimentação
Animal-UFSM

Anexo B - Licença Elsevier para reprodução do Artigo 1

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 20, 2013

This is a License Agreement between Regis A Zanette ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Regis A Zanette
Customer address	Campus UFSM, Predio 20, Sala 4139 Santa Maria, RS 97105900
License number	3273120723872
License date	Nov 20, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Veterinary Microbiology
Licensed content title	Insights into the pathophysiology of iron metabolism in <i>Pythium insidiosum</i> infections
Licensed content author	R.A. Zanette, P.E.R. Bitencourt, S.H. Alves, R.A. Figuera, M.M. Flores, P. Wolkmer, P.A. Hecktheuer, L.R. Thomas, P.L. Pereira, É.S. Loreto, J.M. Santurio
Licensed content date	23 March 2013
Licensed content volume number	162
Licensed content issue number	2-4
Number of pages	5
Start Page	826
End Page	830
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	The role of the iron ion in <i>Pythium insidiosum</i> infection

Anexo C - Licença Oxford University Press para reprodução do Artigo 2

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 20, 2013

This is a License Agreement between Regis A Zanette ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3273140149380
License date	Nov 20, 2013
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Journal of Antimicrobial Chemotherapy
Licensed content title	Iron chelation therapy as a treatment for Pythium insidiosum in an animal model:
Licensed content author	R. A. Zanette, S. H. Alves, M. B. Pilotto, C. Weiblen, R. A. Figuera, P. Wolkmer, M. M. Flores, J. M. Santurio
Licensed content date	05/01/2013
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	The role of the iron ion in Pythium insidiosum infection
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Jan 2014
Permissions cost	0.00 USD
Value added tax	0.00 USD
Total	0.00 USD
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

ANEXO D – Licença John Wiley and Sons para reprodução do Artigo 3

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 20, 2013

This is a License Agreement between Regis A Zanette ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3273120982455
License date	Nov 20, 2013
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	Microbiology and Immunology
Licensed content title	Toll-deficient Drosophila is susceptible to Pythium insidiosum infection
Licensed copyright line	© 2013 The Societies and Wiley Publishing Asia Pty Ltd
Licensed content author	Régis A. Zanette, Janio M. Santurio, Érico S. Loreto, Sydney H. Alves, Dimitrios P. Kontoyiannis
Licensed content date	Oct 13, 2013
Start page	732
End page	735
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Anexo E – Comprovante de submissão do artigo 4

----- Forwarded message -----

From: **JIC Editorial Office** <jic@springer.jp>

Date: 2013/7/16

Subject: JIAC: A manuscript number has been assigned to your manuscript

To: Janio M Santurio <janio.santurio@gmail.com>

Dear Dr Santurio,

Your submission entitled "Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*" has been assigned the following manuscript number: JIAC-D-13-00253.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://jiac.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office

Journal of Infection and Chemotherapy

Anexo F – Comprovante de submissão do artigo 5

Microbes and Infection Contact us Help ? 'My EES Hub' available for consolidated users...[more](#)

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: regnitro@yahoo.com.br Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#) Version: [EES 2013.11](#)

Submissions Being Processed for Author Regis Zanette, Dr

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	MICINF-D-13-00301	Deferasirox activity against <i>Pythium insidiosum</i> is attenuated by iron in vitro and simulates the effects of immunotherapy in vivo	Oct 08, 2013	Jan 07, 2014	Decision in Process

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)