

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

**IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE: EFEITOS SOBRE
OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DOS EQUINOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jean Paul Santos Rocha

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE: EFEITOS SOBRE OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DOS EQUINOS.

por

Jean Paul Santos Rocha

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS, Brasil

2013

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

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

**IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE: EFEITOS SOBRE
OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DOS EQUINOS.**

elaborada por
Jean Paul Santos Rocha

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Janio Morais Santurio, Dr.
(Presidente/Orientador)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra.
(Examinador/UFSM)

Flávio Desessards De La Corte, Dr.
(Examinador/UFSM)

Santa Maria, Maio, 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

**Alberto Meireles da Rocha e
Lucivani de Fátima da Costa Santos**

por seu amor, dedicação e apoio,

compartilho esta conquista com vocês.

“A humildade é o primeiro degrau para a sabedoria”

Tomás de Aquino.

AGRADECIMENTOS

A Deus, com seu milagre da vida, por sempre me guiar no caminho certo, sempre me protegendo, me proporcionando saúde.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram incondicionalmente, me levando nos braços nos momentos de dificuldade, não medindo esforços para que sempre tivesse um porto seguro e tranquilidade para alcançar meus objetivos.

A minha esposa, Valdete Loureiro, por incentivar e apoiar o meu amor à pesquisa.

As minhas irmãs Luciana e Thais, ao meu tio Roberto, pela presença contínua em minha vida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Janio Morais Santurio, exemplo de pesquisador, e de profissional que confiou na minha capacidade técnica e me inspirou a seguir o caminho da pesquisa e do aprimoramento, através de sua amizade, estímulo profissional, e exemplo de homem íntegro, me possibilitou a superar mais este obstáculo na minha vida. Sempre será minha referência acadêmica e na vida profissional, não existem palavras para expressar minha gratidão.

A Prof^a Dr Daniela Bitencourt Rosa Leal, minha coorientadora durante o mestrado, não tenho palavras para agradecer por sua amizade, apoio, disposição, empenho, tolerância e auxílio, imprescindível e incondicional, na concretização deste trabalho.

Ao LAPEMI por me acolher durante estes períodos e oportunizar a realização deste trabalho.

Aos amigos do LAPEMI Régis, Érico, Ayrton, Fran, Carine, Maiara, Pedro, Aline, Fernanda enfim, a todos aqueles que passaram pelo laboratório durante estes períodos de estudo, e me proporcionaram um ambiente acolhedor. Enfim, obrigado a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento da minha pesquisa e que acreditaram e torceram por minha vitória!

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

*“Podemos facilmente perdoar
uma criança que tem medo do
escuro; a real tragédia da vida
é quando os homens têm medo
da luz.”*

Platão

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE: EFEITOS SOBRE OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DOS EQUINOS.

Autor: Jean Paul Santos Rocha

Orientador: Janio Morais Santurio

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 16 de maio de 2013.

A pitiose é uma doença infecciosa, com risco de morte, que acomete animais e humanos, caracterizada por lesões granulomatosas, tendo como agente etiológico o oomiceto *Pythium insidiosum*. O tratamento de infecções causadas por *P. insidiosum* em animais e humanos é complicado pelas características do agente, sobretudo a composição de sua parede celular e membrana plasmática. A imunoterapia surgiu como uma alternativa para o tratamento da pitiose equina, com a produção de imunoterápico a partir de culturas do próprio agente. Apesar dos estudos sobre a doença e a imunoterapia, ainda não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos. Os objetivos deste trabalho foram: a) analisar os parâmetros imunológicos envolvidos na resposta frente à imunoterapia por meio da quantificação da interleucina 2 (IL2) e interferon gama (IFN- γ); b) analisar os parâmetros bioquímicos (função hepática) dos equinos envolvidos no experimento. Para tal foram utilizados 10 equinos, divididos em 2 grupos: controle n=5(animais hígidos sem a doença) e infectado n=5(com pitiose clínica). Todos os 10 animais dos 2 grupos receberam 4 doses do imunoterápico PitiumVac a cada 14 dias. Os parâmetros imunológico dos animais demonstraram uma diferença estatística significativa no grupo infectado após o tratamento com o imunoterápico PitiumVac[®]. Após 42 dias de imunoterapia foi observado um aumentando de forma significativa os níveis séricos de IL-2 e IFN- γ no grupo dos animais infectados, culminando com a cura clínica destes animais. Após a imunoterapia foi constatada uma melhora na função hepática, com a diminuição da alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Este resultado pode ser decorrente da interação distinta do antígeno presente no imunoterápico com o sistema imunológico, provocando o aumento na produção destas citocinas e estabelecendo um predomínio de resposta TH1.

Palavras-chave: Pitiose. *Pythium insidiosum*. Imunoterapia.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

IMUNOTERAPIA CONTRA PITIOSE: EFEITOS SOBRE OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DOS EQUINOS.

Autor: Jean Paul Santos Rocha

Orientador: Janio Morais Santurio

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 16 de maio de 2013.

Pythiosis is a granulomatous, life-threatening disease of humans and animals, which is caused by the oomycete *Pythium insidiosum*. The treatment of the infections caused by this pathogen is complicated because of its cell wall and cytoplasmic membrane characteristics. Therefore, immunotherapy obtained from *P. insidiosum* culture extracts has emerged as an alternative treatment for equine pythiosis. Notwithstanding, the mechanisms by which immunotherapy work are not yet fully understood. The aims of this study were: a) to evaluate the immunological parameters in immunotherapy by measuring interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ (IFN- γ) levels; b) to evaluate the biochemical parameters (hepatic function) in the horses of the experiment. To address this issue, 10 horses were divided in two groups: control (n=5), composed of animals without pythiosis; and infected (n=5), composed of animals with the disease. Animals from both groups received four doses of the immunotherapeutic product PitiumVac[®]. A significant increase in IL-2 and IFN- γ levels was observed after 42 days of immunotherapy in the infected group, and the animals were considered cured. The immunotherapy also improved the hepatic function of the animals, decreasing alanine aminotransferase and alkaline phosphatase levels. This may be a result of the interaction of different immunotherapeutic antigen present in the immune system, causing an increase in the production of these cytokines and establishing a predominance of TH1.

Keywords: Pythiosis. *Pythium insidiosum*. Immunotherapy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho experimental das aplicações do imunoterápico.	27
Tabela 2. Dados clínicos coletados na primeira avaliação do grupo de animais infectados com a pitiose. Todos os animais estavam com lesões no início do desenvolvimento, no máximo 14 dias.....	29
Tabela 3. Demonstrativo do perfil de equinos que compõem o grupo infectado e evolução clínica durante o estudo de dezembro de 2011 a junho de 2012.	32
Tabela 4. Médias leucocitária (/ μ L) observadas entre animais controle (grupo 1) e animais infectados (grupo 2), antes e após a imunoterapia.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Habitat representativo da Região Central do Rio Grande do Sul onde encontravam-se os animais estudados. (B) Áreas de açudes com bastante matéria orgânica e vegetação aquática, onde foram diagnosticados os casos de pitiose. 29

Figura 2. (A) Área necrótica circundada por eosinófilos na reação de Splendori-Hoepli e imagens negativas de hifas (H&E, tamanho da barra 50 μm). (B) Área necrótica circundada por eosinófilos (reação de Splendori-Hoepli) e imagens negativas de hifas (H&E, tamanho da barra 100 μm)..... 30

Figura 3. (A) Equino fêmea de quatro anos de idade, com lesão de pitiose na região venterocaudal do abdômen. (B) Lesão de pitiose na face medial do membro posterior direito de um equino fêmea de oito anos de idade. 31

Figura 4. (A) Equino fêmea com quatro anos de idade que não respondeu à imunoterapia, com piora do seu quadro clínico. (B) Detalhe da lesão de pitiose na glândula mamária. ... 31

Figura 5. Mensuração de IL-2, antes e após a imunoterapia, com aplicação do PitiumVac[®] a cada 14 dias..... 33

Figura 6. Mensuração de IFN- γ , antes e após a imunoterapia, com aplicação do PitiumVac[®] a cada 14 dias. 34

Figura 7. Médias da enzima ALT observadas entre animais do (grupo 1) e animais (grupo 2), antes e depois a imunoterapia..... 35

Figura 8. Médias da enzima FA observadas entre animais do (grupo 1) e animais (grupo 2), antes e depois a imunoterapia..... 35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO	14
2.1. <i>Pythium insidiosum</i>	14
2.2 Pitiose	15
2.3. Histórico	17
2.4 Terapia farmacológica	18
2.5 Terapia fotodinâmica	19
2.6 Imunoterapia.....	20
2.7 Resposta imunológica	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 Principal	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Local do experimento	24
4.2 Animais	25
4.3 Diagnóstico	26
4.4 Aplicação do imunoterápico	26
4.5 Coleta das amostras.....	27
4.6 Avaliação imunológica	27
4.6.1 Ensaio para detecção do IFN- γ	27
4.6.2 Ensaio para detecção da IL-2.....	27
4.7 Avaliação hematológica e função hepática.....	28
4.8 Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS	28
5.1 Avaliação hematológica.....	32
5.2 Dosagem de citocinas IL-2 e INF- γ	33
5.3 Avaliação bioquímica da função hepática	34
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

O agente etiológico da pitiose é o oomiceto aquático *Pythium insidiosum* (DE COCK *et al.*, 1987), micro-organismo atualmente classificado no Reino Stramenipila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e espécie *insidiosum* (WEBSTER, 2007). Através de análise filogenética demonstrou-se que as espécies de *Pythium* estão mais relacionadas a algas diatomáceas do que aos fungos verdadeiros (SCHURKO *et al.*, 2003). *Pythium insidiosum* apresenta hifas com ramificações perpendiculares e zoósporos biflagelados (DE COCK, 1987). Os zoósporos, em ambiente aquático, nadam para invadir e penetrar nos tecidos do hospedeiro (MENDOZA *et al.*, 1993). A patogenicidade é variável com relação às espécies. Em bovinos a pitiose tem um desenvolvimento clínico finalizado com resolução espontânea (SANTURIO *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2005; GRECCO *et al.*, 2009). Em ovinos ocorrem lesões nasais e também disseminadas (TABOSA *et al.*, 2004; SANTURIO *et al.*, 2008; PESSOA *et al.*, 2012) e em humanos com infecção nos vasos sanguíneos (KRAJAEJUM *et al.*, 2008).

A espécie equina é a mais afetada, principalmente nas formas cutânea e subcutânea. Nestes animais, a enfermidade caracteriza-se pelo desenvolvimento de granulomas eosinofílicos de difícil tratamento, com presença de massas necróticas denominadas “kunkers” (MILLER e CAMPBELL, 1982; MENDOZA e ALFARO, 1986; MEIRELES *et al.*, 1993; MENDOZA *et al.*, 1996). A espécie canina é a segunda mais atingida, e as infecções manifestam-se como piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (GROOTERS, 2003). Epidemiologicamente, a presença de grandes áreas alagadiças, vegetação abundante e temperatura média superior a 15-20°C são as condições ideais para o desenvolvimento de *P. insidiosum*, que produz seus zoósporos móveis, responsáveis pelo início da infecção em mamíferos (MILLER *et al.*, 1983). A enfermidade é mais prevalente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (MEIRELES *et al.*, 1993; MENDOZA *et al.*, 1996; SANTURIO *et al.*, 1998), tendo sido relatada na Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua-Nova Guiné, Tailândia (MENDONZA *et al.*, 1996), Venezuela (PEREZ *et al.*, 2005) e África (RIVIERRE *et al.*, 2005).

No Brasil, a pitiose foi descrita em equinos, bovinos, ovinos e caninos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em equinos. A primeira

descrição de pitiose equina ocorreu no Rio Grande do Sul (SANTOS e LONDERO, 1974). Desde então, vários relatos da doença em diferentes estados comprovam a existência da pitiose equina em todo o país (CARVALHO et al., 1984; SANTOS et al., 1987; MEIRELES et al., 1993; TÚRY e COROA, 1997; MONTEIRO, 1999; TABOSA et al., 1999; LEAL et al., 2001; SALLIS et al., 2003). Pantanal brasileiro pela extensão, além de características bioclimáticas e ambientais favoráveis à proliferação e manutenção do patógeno, seja o local de maior ocorrência de pitiose equina no mundo (MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006).

Apesar de não representar um problema de saúde pública, em termos de incidência, a importância da sua investigação é a inexistência de um tratamento eficiente. *P. insidiosum* apresenta um ciclo de vida semelhante a dos fungos e a forma infectante do micro-organismo é o zoósporo, formado através da infecção de plantas aquáticas. A contaminação ocorre através do contato do zoósporo com a pele do hospedeiro, usualmente em uma área de descontinuidade do epitélio, e a progressão da infecção resulta na ulceração cutânea com intenso processo inflamatório (MENDOZA et al., 1993).

Diversos protocolos terapêuticos têm sido testados para pitiose em equinos, como uso de antifúngicos, procedimentos cirúrgicos, terapia fotodinâmica ou associação de ambos, todos muito onerosos, com necessidade de monitoramento técnico constante. A velocidade de evolução da enfermidade (principal fator de insucesso da terapêutica), baixa renda dos usuários, são fatores que limitam a atenção à saúde nas populações de equídeos doentes. Dentre os protocolos atualmente utilizados, a imunoterapia proposta inicialmente por MILLER, (1981), surgiu como alternativa concreta para o controle e vem sendo aperfeiçoada com resultados promissores (MONTEIRO, 1999; MENDOZA et al., 2003; SANTURIO et al., 2003).

A imunoterapia deriva de imunógenos produzidos a partir de culturas do próprio agente da pitiose (hifas sonicadas), e este processo sofreu avanço de maneira significativa a partir de 1998 com a utilização de hifas maceradas (SANTURIO et al., 2006).

O mecanismo envolvido na cura pela imunoterapia proposto por alguns autores são apenas suposições, baseadas em características clínicas, histopatológicas e sorológicas. Acredita-se que durante uma infecção natural por *P. insidiosum* os antígenos (exoantígenos) estimulam uma dinâmica leucocitária peculiar que envolve a sinalização de resposta Th2. Acredita-se que distintamente quando os imunógenos do imunoterápicos PitiumVac[®] são inoculados em um hospedeiro com pitiose a proliferação

leucocitária segue um caminho distinto através de uma resposta celular Th1 sinalizada pela interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (INF- γ).

Neste contexto o presente trabalho visa analisar os efeitos da imunoterapia sobre parâmetros imunológicos em equinos normais e com pitose, pela quantificação da IL-2 e INF- γ .

2. REVISÃO

2.1. *Pythium insidiosum*

Pythium insidiosum é um micro-organismo adaptado a ambientes aquáticos ou solo que pertencem ao Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae. Estudos de relação filogenética entre organismos vivos, utilizando a comparação na seqüência de ácidos nucleicos da subunidade do RNA ribossomal (RNAr), demonstraram que os microrganismos pertencentes ao filo *Oomycota* estavam filogeneticamente distantes dos membros do Reino *Fungi* e mais proximamente relacionados às algas (KWON-CHUNG, 1994), principalmente relacionados à diferença na parede e composição da membrana celular, sendo que nenhum dos oomicetos compartilha da mesma bioquímica dos esteróides como fungos (GROOTERS et al., 2003; SANTURIO et al., 2006).

A distância taxonômica entre oomicetos e fungos ocorre a nível celular, devido a diferenças na composição da membrana e parede celular. Um componente essencial da parede celular fúngica, quitina, geralmente está ausente em oomicetos, que em vez disso possuem predominantemente celulose e β -glucanas. Além disso, os oomicetos diferem dos fungos verdadeiros, pois não possuem ergosterol como principal esteroide da membrana celular. Contudo, nem todos os oomicetos compartilham a mesma bioquímica dos esteróides. Na verdade, os oomicetos consistem de dois grupos básicos de microrganismos; àqueles que são capazes de sintetizar esteróides a partir do mevalonato e aqueles que não podem sintetizar esteróides, como é o caso da maioria das espécies patogênicas para plantas, incluindo *P. insidiosum* (ALEXOPOULOS et al., 1996). Hendrix (1970) observou que em espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium* e *Phytophthora*, os esteróides do ambiente eram incorporados à membrana, ao invés de serem sintetizados como ocorre com os fungos verdadeiros. Em geral, esses esteróides são requeridos para a produção *in vitro* de

estruturas reprodutivas, mas não necessariamente para o crescimento das hifas vegetativas (GROOTERS, 2003).

Atualmente, as técnicas moleculares se constituem em importantes ferramentas para o diagnóstico, identificação e estudos filogenéticos de *P. insidiosum*. Neste contexto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tornou-se uma importante técnica no diagnóstico da pitiose, uma vez que permite a identificação rápida e segura de *P. insidiosum* a partir de cultivos ou tecidos infectados (PEREIRA, 2008; BOTTON et al., 2011).

2.2 Pitiose

Somente um relato em humanos foi registrado no Brasil por Bosco e col(2005), que descreveram uma lesão a partir de um ferimento com um anzol na perna de um homem de 49 anos. O diagnóstico foi confirmado através da técnica de PCR. Porém não é a única espécie conhecida de *Pythium* que infecta seres humanos, pois foi relatado pitiose cutânea, com lesões bilaterais nos membros inferiores em um soldado de 21 anos ferido no Afeganistão em 2009, onde foi isolado e identificado o agente etiológico *Pythium aphanidermatum* (CALVANO et al.,2011). *P. insidiosum* apresenta hifas com ramificações perpendiculares e zoósporos biflagelados (DE COCK, 1987). Os zoósporos, em ambiente aquático, nadam para invadir e penetrar nos tecidos do hospedeiro (MENDOZA et al., 1993). Através de análise filogenética demonstrou-se que as espécies de *Pythium* estão mais relacionadas às diatomáceas e algas do que aos fungos verdadeiros (SCHURKO et al., 2003). Em humanos a pitiose foi pela primeira vez documentada em 1985 (DE COCK, 1987). Desde então, vários casos humanos têm sido notificados, sendo a doença marcada por elevadas taxas de morbidade e mortalidade (TANPHAICHITRA, 1989; CHETCHOTISAKD, 1992; VIRGILE et al., 1993; WANACHIWANAWIN et al., 2004; BOSCO et al., 2005; PUPAIBOOL, 2006).

A espécie equina é a mais afetada, principalmente nas formas cutâneas e subcutâneas. Nestes animais, a enfermidade caracteriza-se pelo desenvolvimento de granulomas eosinofílicos de difícil tratamento, com presença de massas necróticas eosinofílicas denominadas “kunkers” (MILLER e CAMPBELL, 1982; MENDOZA e ALFARO, 1986; MEIRELES et al., 1993; MENDOZA et al., 1996). A espécie canina é a

segunda mais atingida, e as infecções manifestam-se como piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (GROOTERS, 2003). Epidemiologicamente, a presença de grandes áreas alagadiças, vegetação abundante e temperatura média superior a 15-20°C são as condições ideais para o desenvolvimento de *P. insidiosum*, que produz seus zoósporos móveis, responsáveis pelo início da infecção (MILLER et al., 1983). A enfermidade é mais prevalente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (MEIRELES et al., 1993; MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 1998), tendo sido relatada na Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua-Nova Guiné, Tailândia (MENDONZA et al., 1996), Venezuela (PEREZ et al., 2005) e África (RIVIERRE et al., 2005).

No Egito, entre Outubro de 2008 e Janeiro de 2011 foi diagnosticado um total de 33 equinos de tração com pitiose cutânea, os quais foram encaminhados para um Hospital Veterinário. Estes animais apresentavam as lesões localizadas em sua maioria (72%), na região ventral do tórax e abdômem (MOSBAH et al., 2011).

No Brasil, a pitiose foi descrita em equinos, bovinos, ovinos e caninos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em equinos. A primeira descrição de pitiose equina ocorreu no Rio Grande do Sul (SANTOS e LONDERO, 1974). Desde então, vários relatos da doença em diferentes estados do Brasil comprovam a existência da pitiose equina em todo o país (CARVALHO et al., 1984; SANTOS et al., 1987; MEIRELES et al., 1993; TÚRY e COROA, 1997; MONTEIRO, 1999; TABOSA et al., 1999; LEAL et al., 2001; SALLIS et al., 2003;). MENDONZA et al. (1996) citam que o Pantanal brasileiro é provavelmente o local de maior incidência e prevalência de pitiose equina do mundo.

Uma vez no hospedeiro, *P. insidiosum* induz a uma reação granulomatosa eosinofílica com células gigantes, mastócitos, macrófagos e poucos linfócitos. Os eosinófilos na tentativa de fagocitar o micro-organismo são degranulados sobre a hifa. Em equinos, esta reação é extremamente pronunciada, o que leva a formação de massas firmes semelhantes a corais, conhecidas como “kunkers”, compostas por eosinófilos degranulados intercalados por hifas viáveis de *P. insidiosum* (MENDONZA et al., 1996). Acredita-se que essas estruturas ajudem na proteção do fungo frente às células de defesa do hospedeiro, pois o agente fica preservado dentro do material eosinofílico. Sendo assim, esta estratégia pode proteger o patógeno do reconhecimento pelo sistema imunológico, assegurando sua presença nos tecidos infectados (MILLER, 1981; MENDOZA et al., 1992; MENDOZA et al., 2003). Não há predisposição por gênero, idade ou raça e a fonte de infecção são os

zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e o homem (MENDOZA et al., 1996).

2.3. Histórico

As manifestações clínicas da infecção por *P. insidiosum* foram primeiramente reconhecidas em meados do século XIX por veterinários britânicos na Índia, que observaram uma doença granulomatosa crônica cutânea de cavalos. Em fins do século XIX, uma etiologia fúngica foi proposta para a doença por vários pesquisadores com base em achados histológicos (GROOTERS, 2003). O isolamento do agente causador da pitiose foi efetuado em 1901 pelos pesquisadores holandeses Haan & Hoogkamer que trabalhavam com equinos na Indonésia. A esporulação não foi induzida, e, portanto, foi assumido ser um fungo “zigomiceto” ou “ficomíceto”, baseado nas características morfológicas das suas hifas vegetativas. A identificação propriamente dita ocorreu somente em 1961, recebendo o nome de *Hyphomyces destruens* (BRIDGES e EMMONS, 1961). No ano de 1974, Austwick e Copland verificaram a capacidade desse agente em produzir zoósporos biflagelados, uma característica peculiar que permitiu classificá-lo como um fungo da família *Pythiaceae*, ordem *Peronosporales* que deveria ser incluído no gênero *Pythium*. No entanto, a denominação *Hyphomyces destruens* continuou sendo utilizada nas descrições da doença (MCMULLAN, 1977). Em 1980, Ichitani e Amemiya compararam as características reprodutivas de diferentes espécies de *Pythium* e classificaram um isolado de equino como *Pythium gracile*. Em 1987, DE COCK *et al.* analisaram isolados de equinos, bovinos, cães e humanos e concluíram que se tratava do mesmo organismo, o qual foi denominado *P. insidiosum* e que essa nova espécie era igual às anteriormente descritas (*Pythium sp* ; *P. gracile* ; e *H. destruens*). Também em 1987, Shipton analisou um isolado de equino da Austrália e classificou-o como uma nova espécie: *Pythium destruens*. A nomenclatura *P. insidiosum* foi definitivamente estabelecida em 1989, quando Mendoza e Marin demonstraram que os isolados *P. insidiosum* e *P. destruens* apresentavam o mesmo perfil antigênico. Embora o nome do agente tenha sido estabelecido, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes. No início do século 20, verificou-se em achados contemporâneos, que granulomas equinos poderiam ser causados por nematóides do gênero *Habronema*. Assim, relatos daquela época foram sub-dimencionados pela nova hipótese, nos quais se

utilizou indiscriminadamente o termo ‘habronemose cutânea equina’ tendo como consequência, o desuso e esquecimento da provável etiologia fúngica, que fora retomada algo em torno de trinta e sete anos depois (MENDOZA et al., 1996).

2.4 Terapia farmacológica

O tratamento de infecções causadas por *P. insidiosum* em animais e humanos é complicado devido às características do agente, sobretudo à composição de sua parede celular e membrana plasmática. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede celular, enquanto *P. insidiosum* contém celulose. A membrana plasmática não contém esteroides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria dos agentes antifúngicos (FOIL, 1996). Devido a estas características, os tratamentos convencionais à base de monoterapia antifúngica têm sido ineficazes.

No caso da pitiose equina, o tratamento tradicional é a excisão cirúrgica. Esta requer a retirada de toda a área afetada com margem de segurança para evitar recidivas (MILLER, 1981). Todavia, o tratamento cirúrgico apresenta bons resultados somente em lesões pequenas e superficiais, onde não há presença de ligamentos ou grandes vasos e onde seja possível suturar as bordas de epitélio. O sucesso das diferentes formas de tratamento é variável e, em muitos casos, influenciado pelo tamanho e tempo de evolução da lesão, idade e estado nutricional.

A utilização de caspofungina, um novo antifúngico derivado das equinocandinas, cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição não competitiva da enzima β (1,3) -D-glucana sintetase, poderia ser uma alternativa interessante. Essa droga impede a síntese de β -glucanas da parede celular, componente essencial para integridade estrutural e estabilidade osmótica das células fúngicas. Pereira et al. (2007) avaliaram a suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados de *P. insidiosum* frente à caspofungina e ainda relacionaram estes achados com a resposta da terapia *in vivo* em coelhos com pitiose experimental. Contudo, este estudo sugeriu que *P. insidiosum* é pouco suscetível à caspofungina *in vitro* e *in vivo*.

As associações antifúngicas têm sido pouco estudadas em micologia médica, e suas atividades contra *P. insidiosum* são quase desconhecidas; na pitiose humana, há relatos de sucesso pela combinação terbinafina e itraconazol (SHENEP, 1998). A combinação de drogas de diferentes grupos pode ser uma estratégia de tratamento útil quando a monoterapia não encontra resultados satisfatórios. A terbinafina pertence ao grupo das

alilaminas e atua especificamente em um estágio precursor de biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima esqualeno-epoxidase (GOSBELL, 2003).

Dessa forma, Argenta et al. (2008) testaram a atividade *in vitro* da terbinafina combinada com voriconazol, e da terbinafina combinada com itraconazol. Efeito sinérgico de 17% foi encontrado em ambas as combinações, e indiferença foi encontrado em 83% dos isolados.

Em função disso, numerosos testes de atividade *in vitro* têm explorado as interações entre os agentes antifúngicos contra diversos fungos patogênicos. Nessa linha de pesquisa, Cavalheiro et al. (2009) verificaram a suscetibilidade *in vitro* de 17 isolados do oomiceto *P. insidiosum* frente ao antifúngico terbinafina e suas associações com miconazol, fluconazol, cetoconazol, caspofungina, anfotericina B, fluvastatina, rifampicina, ibuprofen 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. Terbinafina mais ibuprofeno foi indiferente para 82,35%. Antagonismo foi observado em combinações de terbinafina com fluvastatina (35,3%) e rifampicina (5,88%).

2.5 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que combina o uso de luz, oxigênio e compostos fotossensíveis para causar morte às células-alvo. A utilização da técnica teve início em Munique, por Raab e von Tappeiner que observaram o efeito tóxico causado pelo laranja de acridina em células de paramécio na presença de luz. Em 1903 ocorreu a primeira aplicação clínica da técnica com a utilização de eosina e luz para o tratamento de lúpus vulgaris, sífilis, psoríases e câncer de pele superficial (ACKROYD, 2001).

Em um estudo de pitiose induzida em coelhos, após a terapia fotodinâmica, a análise histológica revelou ausência de infecção de até 1 cm de profundidade na pele lesionada,

mostrando que a terapia fotodinâmica pode representar uma nova abordagem para o tratamento da pitiose (PIRES et al., 2013).

2.6 Imunoterapia

Dentre os protocolos atualmente utilizados, a imunoterapia proposta inicialmente por Miller (1981) surgiu como alternativa concreta para o tratamento e vem sendo aperfeiçoada sob diferentes técnicas de processamentos com resultados. Em 1992, Mendoza e colaboradores avaliaram uma nova vacina em 18 equinos e 6 caninos, associada á cirurgia e fármacos antifúngicos. Dos equinos, 13 responderam à terapia e foram curados. Cinco deles não apresentaram resposta e foram a óbito. As lesões variaram de 60X40 mm a 300X300 mm, com duração entre 15 dias e mais de 2 meses. O tamanho da lesão e sua duração não apresentaram relação significativa com a cura dos animais. Nos cães, um deles apresentou a doença gastrointestinal e não respondeu ao tratamento. Dos outros cinco animais, apenas dois foram curados. As lesões variaram de 30X20 mm a 100x50mm e também não houve relação entre o tamanho das lesões e a resposta obtida com o tratamento (MENDOZA et al., 2003).

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 e CAMPBELL, 1982).

Baseados na técnica originalmente descrita foi utilizado o antígeno obtido do sobrenadante de culturas de *P.insidiosum*, com o objetivo de diminuir a reação no local de aplicação e induziram, desta forma, a recuperação de três animais entre os cinco tratados. (MENDOZA et al., 1992) compararam duas vacinas para o tratamento da pitiose equina em 71 cavalos infectados. Uma vacina utilizou massa celular como antígeno e a outra utilizou um antígeno solúvel concentrado. As duas vacinas apresentaram resultado positivo em cavalos com lesões com menos de dois meses, com 60% e 70% de eficiência, respectivamente.

No Brasil, o teste de eficiência de um imunoterápico para o tratamento da pitiose equina, produzido a partir de culturas *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). 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. Na produção deste imunoterápico (PitiumVac^{®*}) utilizou-se um cultivo de *P. insidiosum* isolado a partir de um potro com pitiose clínica no município de Jaguari, RS, Brasil, confirmado pelo Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Holanda) e registrado sob o número CBS 101555. Shurko et al., (2003) utilizaram este isolado (CBS 101555) para estudar as diferenças moleculares entre cepas de *P. insidiosum* originárias da Ásia, Austrália e Américas. O isolado CBS 101555 mostrou, nesta publicação, o mesmo perfil molecular de isolados de equinos da Costa Rica e Estados Unidos (SANTURIO, 2004).

Após os insucessos de tratamentos a base de anfotericina B, iodetos, cetoconazol e cirurgia, a utilização de um imunoterápico em um menino talassêmico de 14 anos de idade, infectado por *P. insidiosum*, induziu a cura após duas aplicações (100µl) com intervalo de 14 dias (THITITHANYANONT et al., 1998).

Apesar dos estudos sobre a doença e a imunoterapia, ainda não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção por *P. insidiosum*, em parte pelas diferenças entre *P. insidiosum* e os fungos patogênicos para os mamíferos. De acordo com (Miller (1981), o caráter progressivo da doença em equinos imunocompetentes sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio na resposta imunológica. O possível mecanismo imunológico desencadeado na pitiose equina foi proposto por Mendoza et al., (1996).

2.7 Resposta imunológica

A interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- γ) fazem parte de um grupo de substâncias denominadas citocinas, que são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune. A produção de citocinas é desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. As citocinas atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune (THOMSON, 2003).

* LAPEMI/UFSM/EMBRAPA-Pantanal

Atualmente, já foram descritas mais de 200 diferentes citocinas, pertencentes às famílias de hematopoietinas, interferons, quimiocinas e fator necrose de tumoral (TNF). Originalmente, as citocinas e quimiocinas eram nomeadas de acordo com a sua função como fator de crescimento de células T, agora chamada IL-2, mas devido às suas ações pleiotrópicas, a nomenclatura mudou para números para facilitar o entendimento (PARSLOW, 2004).

Embora diversos tipos celulares possam secretar citocinas, células T, macrófagos e células dendríticas são as principais fontes produtoras de citocinas. Durante a resposta imune celular adaptativa ocorre intensa produção de citocinas, porém vale ressaltar que a produção de citocinas não depende do antígeno, ou seja, não é antígeno-específica, portanto, as citocinas agem sobre qualquer tipo celular que tenha o receptor apropriado. As citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 inibem a produção das citocinas Th2 e vice-versa, por um mecanismo chamado regulação cruzada. Essa regulação cruzada explica a relação inversa frequentemente observada entre produção de anticorpos, estimulada pelos linfócitos Th2, e imunidade celular, desencadeada pelos linfócitos Th1 (DONG, 2006).

Com os avanços da microscopia com células vivas foi possível visualizar dinamicamente a secreção de citocinas durante a sinapse imunológica, processo caracterizado por modificações moleculares e estruturais no sítio de contato entre linfócitos T e células apresentadoras de antígenos (APC). Linfócitos T *helper* ativados produzem várias citocinas e algumas, como IL-2 e IFN- γ , são secretadas diretamente na sinapse imunológica, em direção a APC, enquanto outras, como TNF, são secretadas de maneira multidirecional. Esses padrões variados de secreção de citocinas têm implicação direta no curso de uma resposta inflamatória.

A secreção restrita à região da sinapse vai atuar diretamente na comunicação célula-célula, podendo estar relacionada à especificidade da resposta imune adaptativa. Já a secreção multidirecional pode estar relacionada ao recrutamento de outras células inflamatórias, permitindo a manutenção do processo inflamatório. Portanto, o tipo de resposta imune não depende apenas do tipo de citocina produzida, mas também de como ela é secretada no microambiente (CURFS et al., 1997).

Acredita-se que os mecanismos envolvidos na cura da pitiose pela imunoterapia baseiam-se principalmente na resposta celular. Este fato é sustentado pelas alterações teciduais após início da imunoterapia, com mudança de inflamação eosinofílica inicial para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T ao final da resposta. Possivelmente, os antígenos presentes no imunógeno induzam esta alteração no

padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais (MENDOZA et al., 1996). Além disso, Thitithanyanont et al., (1998) sugeriram que a cura observada na imunoterapia poderia ser decorrente de uma mudança da resposta mediada pela subpopulação de linfócitos Th2 para uma resposta mediada pela subpopulação de linfócitos Th1. Observações posteriores reafirmam esta hipótese (MENDOZA et al., 2003; WANANACHIWANAWIN et al., 2004).

Mendoza e Newton (2005) propuseram que quando o hospedeiro entra em contato, através de uma ferida, com zoóporos de *P. insidiosum* este forma um tubo germinativo que penetra mecanicamente no tecido. Uma vez nos tecidos, as hifas liberariam exoantígenos que provocam uma resposta imune com estimulação da subpopulação de linfócitos Th2, e portanto, com presença de eosinófilos, mastócitos, IgE, interleucina 4 e interleucina 5. A constante produção destes exoantígenos induziria a uma resposta imune vinculada à subpopulação Th2. A grande quantidade de eosinófilos degranulados, que provoca a reação de Splendori-Hoepli, e mastócitos em torno das hifas é responsável pelas lesões observadas nos tecidos. Provavelmente, a reação de Splendori-Hoepli e a secreção de exoantígenos sejam estratégias evolutivas desenvolvidas por *P. insidiosum* que asseguram a sua proliferação tecidual. Esta hipótese é suportada pelo fato que hifas viáveis somente são encontradas dentro da reação eosinofílica ou no interior dos “kunkers”, indicando que *P. insidiosum* pode utilizar o fenômeno de Splendori-Hoepli e “kunkers” para sobreviver. Inversamente, tem sido constatado que durante a imunoterapia, a liberação de antígenos citoplasmáticos estimula uma resposta mononuclear que resulta em cura. Estes encontros fortemente sugerem que os antígenos da vacina, promovem uma regulação negativa da resposta Th2. Mendoza et al., (1992), ao analisar o soro de equinos infectados, testados pelo immunoblot, demonstraram a presença de três proteínas imunodominantes de 28, 30 e 32 kDa. Já em amostras de soro obtidas um ano após a cura pela imunoterapia observou-se reações fracas contra esses mesmos antígenos, sugerindo que podem ser importantes imunógenos envolvidos na cura pela imunoterapia. É provável, que estes imunógenos sejam apresentados ao sistema imune de uma forma diferente que durante a infecção natural, estimulando assim, uma outra subpopulação de linfócitos T auxiliares, preferencialmente linfócitos Th1 (MENDONZA et al., 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Principal

Analisar o efeito da imunoterapia sobre parâmetros imunológicos em equino com pitiose pela quantificação da IL-2 e do IFN- γ .

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a IL2 e IFN- γ em equinos com pitiose e normais, submetidos à imunoterapia;
- Analisar a função hepática em equinos com pitiose e normais, submetidos à imunoterapia;
- Analisar o hemograma em equinos com pitiose e normais, submetidos à imunoterapia.

4. METODOLOGIA

4.1 Local do experimento

O experimento foi realizado nos períodos de dezembro de 2011 a junho de 2012, conduzido em uma propriedade rural na região central do estado (29°43'-29°44'S; 53°42'-53°44'W), altitude média de 80 metros, uma área com 10.000 hectares localizada no município de Santa Maria, situado na depressão central do estado do RS, e uma outra área de 340 hectares situada no município de São Sepé-RS (30°09'38" S; 53°33'55"W), altitude média de 80 metros. As duas áreas possuem características semelhantes, pois se tratam de regiões isoladas e controladas, livres de trânsito de animais de outras regiões, e com as mesmas condições bioclimatológicas (índice pluviométrico, temperatura), e com presença de açudes de tamanho médio de baixa profundidade. Foi observado em ambas as áreas um mosaico constituído aproximadamente de 35% de floresta estacional decidual, 60% de campo, 5% de banhado.

Após as coletas de fragmentos de lesões de pitiose, os materiais eram

encaminhados para avaliações sorológicas e histopatológicas, as quais foram desenvolvidas nas dependências do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), pertencente ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário Universitário, e para o Laboratório de Análises Clínicas Veterinária do Hospital Veterinário Universitário.

4.2 Animais

Foram utilizados 10 eqüinos, divididos em 2 grupos. O grupo 1 (n=5) constituído por 5 animais em perfeitas condições clínicas, sem raça definida (SRD), incluindo machos e fêmeas, entre 5 e 15 anos de idade. O grupo 2 (n=5) constituído por 5 animais doentes com pitiose, SRD, de ambos os sexos, entre 18 meses e 15 anos. Todos os 10 animais eram mantidos em sistema de semi-estabulagem. A alimentação diária era constituída de pastagens (aveia, azevém, milheto), e 3 Kg de ração de manutenção por dia administrada no final da tarde, água *ad libitum*. Antes do início do experimento, todos os animais foram pesados e identificados por meio de ficha solípede. Os animais de ambos os grupos conviviam no mesmo ambiente e com as mesmas condições de manejo, sem nenhuma distinção entre eles.

Todos os animais ficaram isolados e não receberam nenhum tipo de tratamento alternativo, ou paliativo, como antifúngicos, corticosteróides e antibióticos, a fim de que não houvesse interferência nas avaliações imunológicas, bioquímicas e hematológicas. Antes do início do trabalho todos os animais do Grupo 1 realizaram teste de ELISA para detecção de anticorpos contra *P. insidiosum* e confirmação de sua negatividade para pitiose.

A aplicação do imunoterápico foi feita nos dois grupos, no mesmo dia e com um intervalo de 14 dias, totalizando quatro aplicações. A coleta de material para avaliação dos parâmetros era feita após cada aplicação.

4.3 Diagnóstico

Para o diagnóstico de pitiose (grupo 2), fragmentos de tecido da lesão inicial foram obtidos por biópsias incisionais após a tranquilização com acepromazina 0,03mg/kg e induzidos anestesia dissociativa com detomidina 0,02 mg/Kg e cetamina 2 mg/Kg. Após a coleta, os fragmentos foram acondicionados em formol tamponado 10% e encaminhados ao Laboratório Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e em recipientes plásticos à temperatura ambiente para o Laboratórios Pesquisas Micológicas (LAPEMI), para isolamento e cultivo do agente causal.

Para o isolamento, os fragmentos de tecidos foram lavados em água estéril e em seguida semeados em tubos com tampa de rosca contendo Meio Mínimo, Agar Saboraud Dextrose (ASD) ou Micosel e após foram incubados a 37°C por 48 horas. A identificação considerou características macroscópicas e microscópicas de *P. insidiosum*, além da indução da zoosporogênese (PEREIRA et al., 2007). Adicionalmente, realizou-se caracterização molecular (PCR) nos tecidos, segundo (BOTTON et al. 2011), com *primers* específicos para *P. insidiosum*.

Para a histopatologia, os fragmentos de tecidos fixados em formalina 10% foram processados por técnicas de rotina, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e pramatenamina de Grocott (GMS) (PROPHET et al., 1992).

Amostras de sangue, para obtenção de soro, foram colhidas por punção da veia jugular, utilizando-se agulhas hipodérmicas 40x12 mm. A pesquisa de anticorpos específicos anti-*Pythium*, no soro dos equinos, foi realizada, pela técnica ELISA indireto (SANTURIO et al., 2006) junto ao LAPEMI da Universidade Federal de Santa Maria.

Os animais do grupo controle (grupo 1) também foram avaliados sorologicamente por ELISA, sendo o resultado negativo o requisito para compor o grupo.

4.4 Aplicação do imunoterápico

Todos os 10 animais foram submetidos à imunoterapia (PitiumVac[®]), através de aplicações subcutâneas, a intervalos de 14 dias, conforme protocolo do fabricante e estudos anteriores (SANTURIO et al., 2003; DFTHN). Foram efetuadas 4 aplicações, totalizando 42 dias de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1. Desenho experimental das aplicações do imunoterápico.

Período (dias)	Aplicação PitiumVac [®]		Coleta de sangue	
	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 1	GRUPO 2
0	X	X	X	X
14	X	X	X	X
28	X	X	X	X
42	X	X	X	X

4.5 Coleta das amostras

A coleta de sangue foi realizada em todos os animais dos Grupos 1 e 2, simultânea à aplicação do imunoterápico com intervalo de 14 dias entre uma coleta e outra, totalizando 4 coletas. Foi utilizado o sistema de vácuo (tubos de vidro de 10ml) e agulhas (40x12) descartáveis para realizar a punção da veia jugular. Após a coleta, 5 ml do sangue foram transferidos para tubos de 10 ml para obtenção de soro, para a avaliação imunológica e bioquímica, e 5 ml de sangue transferidos para um tubo contendo etileno diamina tetracetato dissódico (EDTA) para realização de hemograma.

4.6 Avaliação imunológica

4.6.1 Ensaio para detecção do IFN- γ

O soro dos animais foi separado por centrifugação e após foi realizado o ensaio ELISA para detectar a presença de IFN- γ através do kit Horse IFN- γ (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, U.S.A.). As absorbâncias das amostras foram verificadas a 450 nm num leitor para placas de 96 poços. As concentrações de IFN- γ nas amostras foram calculadas a partir de curvas padrão, conforme orientação do fabricante.

4.6.2 Ensaio para detecção da IL-2

A presença de IL-2 foi detectada no soro dos animais, previamente centrifugados, através do kit ELISA Horse IL-2 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, U.S.A.) de acordo com as orientações do fabricante. As absorbâncias das amostras foram verificadas a 450 nm num leitor para placas de 96 poços. As concentrações de IFN- γ nas amostras foram calculadas a partir das curvas padrão, conforme orientação do fabricante.

4.7 Avaliação hematológica e função hepática

As amostras de sangue sem anticoagulante, para obtenção do perfil bioquímico sérico, foram centrifugadas a 1.000 g, durante 10 minutos, para separação do soro. A atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) foram mensurados utilizando-se conjuntos de reagentes de uso comercial (Labtest Diagnóstica). As leituras dos parâmetros bioquímicos (função hepática) foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático (Labquest), com comprimento de onda específico para cada constituinte. De cada amostra de sangue colhida com EDTA foram aferidos os dados relativos às contagens de hemácias e de leucócitos, ao teor de hemoglobina e ao volume globular, em analisador automático (pocH – 100 iV Diff).

4.8 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram avaliados através da estatística descritiva (média, desvio padrão) e submetidos à análise de variância. A análise post hoc foi realizada pelo teste de Bonferroni e teste múltiplo de Dunn de comparação.

5. RESULTADOS

No período de dezembro de 2011 a junho de 2012 foram estudados dois grupos de animais em uma área homogênea na região central do estado do Rio Grande do Sul. Estes equinos ficavam em açudes onde existiam três variáveis comuns: solo inundável com drenagem lenta, abundância de vegetação aquática e altas temperaturas. Comportamentalmente, estes equinos permanecem longos tempos ociosos ou pastando

em locais com acúmulo de água, com membros totalmente ou parcialmente submersos, e em nenhum momento houve influência externa como transporte de uma área para outra ou tratamentos alternativos, a não ser a imunoterapia (Figura 1).

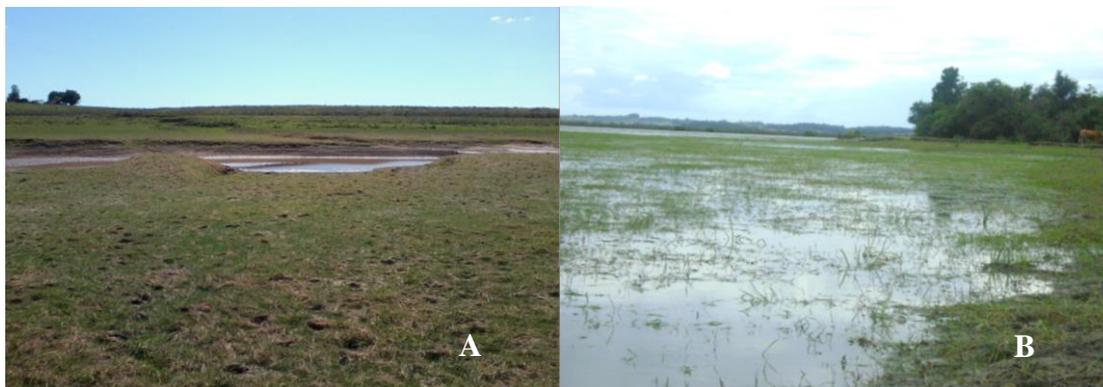


Figura 1. (A) Habitat representativo da Região Central do Rio Grande do Sul onde encontravam-se os animais estudados. (B) Áreas de açudes com bastante matéria orgânica e vegetação aquática, onde foram diagnosticados os casos de pitiose.

Os animais do grupo infectado (grupo 2) eram compostos por machos e fêmeas, entre 18 meses e 15 anos, sem raça definida, totalizando cinco animais (n=5). Todos os casos foram observados no início do verão onde as temperaturas eram superiores a 30°C. A dinâmica da evolução das lesões variou de sete dias a duas semanas, notando-se rápida perda de peso, comparando-se a animais do grupo controle. Os animais do grupo infectado demonstraram o mesmo perfil clínico na fase aguda da infecção (Tabela 2).

Tabela 2. Dados clínicos coletados na primeira avaliação do grupo de animais infectados com a pitiose. Todos os animais estavam na fase aguda, no máximo 14 dias do aparecimento das primeiras lesões.

Caso	Frequência cardíaca	Temperatura	Coloração da mucosa oral	Tempo de enchimento capilar (segundos)
1	120 bpm	39,5° C	Normais	2,0
2	90 bpm	39,0° C	Normais	2,0
3	80 bpm	38,5° C	Normais	2,0
4	100 bpm	40,0° C	Ictéricas	3,5
5	90 bpm	38,5° C	Normais	2,0

As lesões iniciais eram perfeitamente circunscritas, apresentando-se côncavas ao centro e com bordas elevadas mostrando-se nítida a transição com a pele intacta. Os diâmetros variaram de 3 a 10 cm, ulceradas, úmidas, brilhantes, em sua totalidade com tecidos necróticos invadindo galerias cutâneas profundas e presença de massas branco-amareladas semelhantes a corais (*kunkers*) no seu interior. O estudo histológico das lesões apresentava as mesmas características com áreas multifocais de necrose eosinofílica, compostas por eosinófilos íntegros e degenerados e fibrina, correspondendo aos *kunkers* vistos na macroscopia. Em meio às áreas de necrose haviam imagens negativas tubuliformes e ramificadas, interpretadas como hifas. Algumas hifas eram circundadas por material fortemente eosinofílico, levemente radiado, correspondendo à reação de Splendore-Hoepli. Circundando as áreas de necrose havia infiltrado inflamatório composto por eosinófilos, alguns macrófagos, plasmócitos e neutrófilos e raras células gigantes multinucleadas, entremeando acentuada proliferação de tecido conjuntivo fibroso associado à neovascularização (tecido de granulação) (Figura 2).

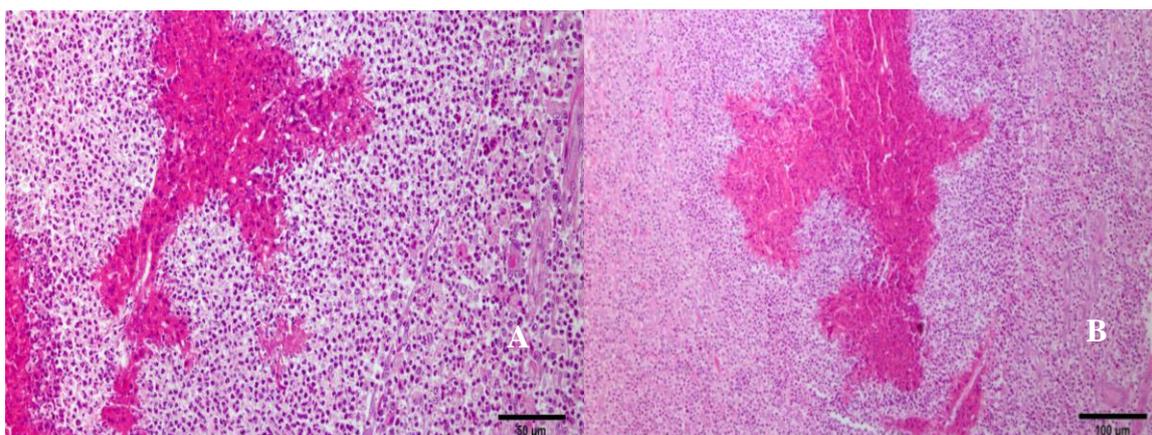


Figura 2. (A) Área necrótica circundada por eosinófilos na reação de Splendore-Hoeppli e imagens negativas de hifas (H&E, tamanho da barra 50 μm). (B) Área necrótica circundada por eosinófilos (reação de Splendore-Hoeppli) e imagens negativas de hifas (H&E, tamanho da barra 100 μm)

As lesões foram encontradas com maior frequência na região ventral do tórax e abdômen (85%) e em alguns casos tiveram disseminação na glândula mamária, (Figura 3).



Figura 3. (A) Equino fêmea de 4 anos de idade, com lesão de pitiose na região venterocaudal do abdômen. (B) Lesão de pitiose na face medial do membro posterior direito de um equino fêmea de 8 anos de idade.

Após a segunda avaliação clínica um animal não respondeu de forma satisfatória à imunoterapia, piorando o seu estado a cada avaliação, apresentando um aumento da lesão na glândula mamária. (Figura 4).



Figura 4. (A) Equino fêmea com 4 anos de idade que não respondeu à imunoterapia, com piora do seu quadro clínico. (B) Detalhe da lesão de pitiose na glândula mamária.

Nos animais do grupo infectado a eficiência do imunoterápico foi satisfatória (80%) e na avaliação clínica a resposta ao tratamento foi uniforme independente do sexo do animal e do local das lesões, que ficaram restritas ao tórax e abdômen (Tabela 4).

Tabela 3. Demonstrativo do perfil de equinos que compõe o grupo infectado e evolução clínica durante o estudo de dezembro de 2011 a junho de 2012.

	Descrição dos animais		Descrição das lesões		Dinâmica terapêutica	
	Idade	Sexo	Local	Evolução (dias)	Tratamento(doses)	Evolução
1.	10 anos	Macho	Tórax	7	2	Satisfatória
2.	2 anos	Fêmea	Abdômen	10	5	Satisfatória
3.	1 ano	Fêmea	Abdômen	7	2	Satisfatória
4.	4 anos	Fêmea	Abdômen	7	4	Desfavorável
5.	12 anos	Fêmea	Tórax	14	5	Satisfatória

Na aplicação do PitiumVac[®] todos os animais do grupo controle apresentaram uma elevação de temperatura, onde 100% dos animais registraram valores acima de 39,8° C e apatia que durou cerca de 24 horas. O mesmo quadro foi registrado nos animais infectados.

5.1 Avaliação hematológica

O leucograma dos animais do grupo infectado tratados com o imunoterápico (grupo 2) quando comparados aos animais do grupo controle (grupo 1) demonstraram diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Bonferroni e teste múltiplos de Dunn ($P < 0.05$), o mesmo foi observado para segmentados (Tabela 5).

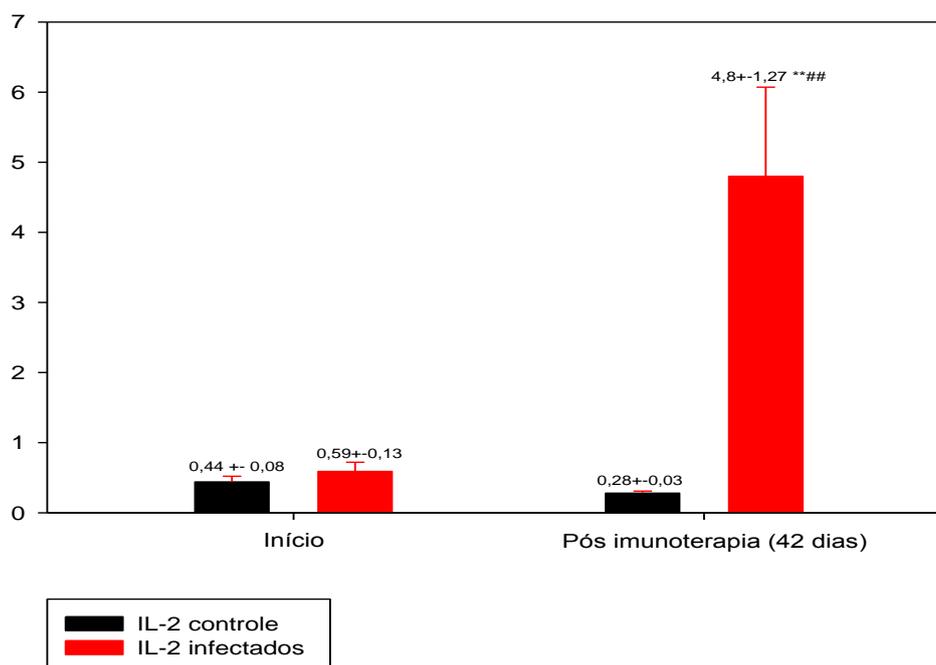
Tabela 4. Médias leucocitária (/ μ L) observadas entre animais controle (grupo 1) e animais infectados (grupo 2), antes e após a imunoterapia.

	Antes da Imunoterapia		42 dias após a Imunoterapia		Referência
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	
Leucograma	8.300 \pm 490	15.940 \pm 1.610*	16.700 \pm 750	13.400 \pm 380	7.000-14.000
Segmentados	4.040 \pm 60	11.710 \pm 1.190**	7.100 \pm 100	8.040 \pm 1.750	2.100-9.100
Basófilos	55 \pm 28	20 \pm 20	383 \pm 383	96 \pm 66	0-520
Eosinófilos	174 \pm 51	124 \pm 56	1160 \pm 125	599 \pm 283	35-1540
Linfócito	3.730 \pm 410	3.030 \pm 730	7.750 \pm 390	5.580 \pm 1.330	1.750-9.800
Monócitos	2.190 \pm 200	6.130 \pm 1.860	170 \pm 170	3.240 \pm 890	35-980

Diferenças estatisticamente significativa * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (Grupos comparados com o grupo controle).

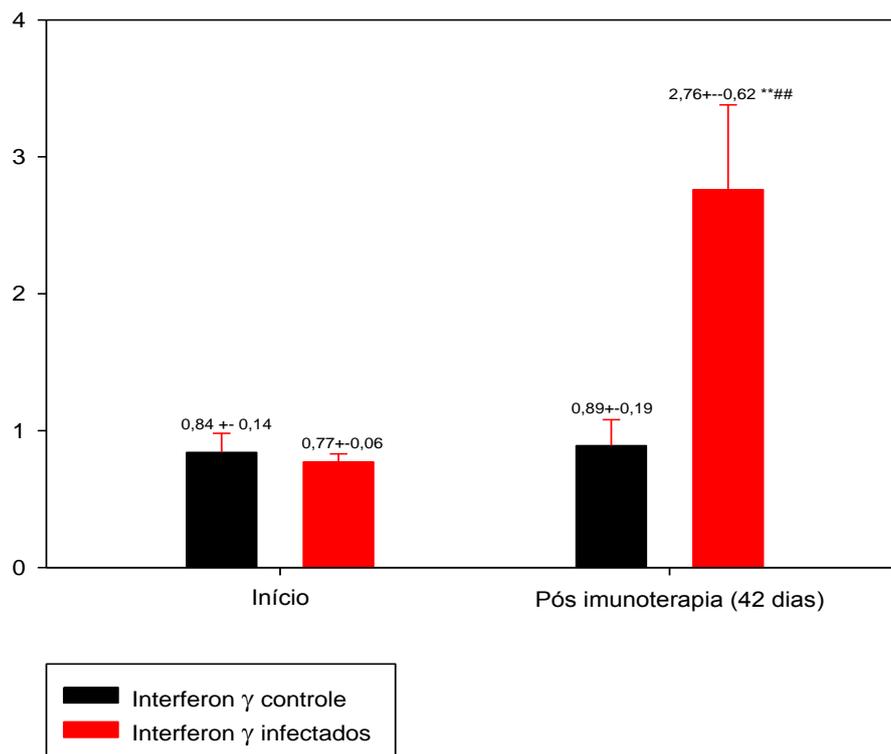
5.2 Dosagem de citocinas IL-2 e INF- γ

A quantificação sérica para IL-2 e IFN- γ dos animais do grupo infectado quando comparado aos animais do grupo controle ($P < 0.01$, $n=5$) e o perfil do grupo infectado quando comparado antes e depois do tratamento ($P < 0.01$, $n=5$) demonstraram diferenças estatisticamente significativa pelo teste de Bonferroni e teste múltiplos de Dunn (Figura 5 e 6).



Diferenças estatisticamente significativa $**P < 0.01$ (Grupos comparados com o grupo controle), $##P < 0.01$ (Grupo “infectado” antes e pós imunoterapia).

Figura 5. Mensuração de IL-2, antes e após a imunoterapia, com aplicação do PitiumVac[®] a cada 14 dias.

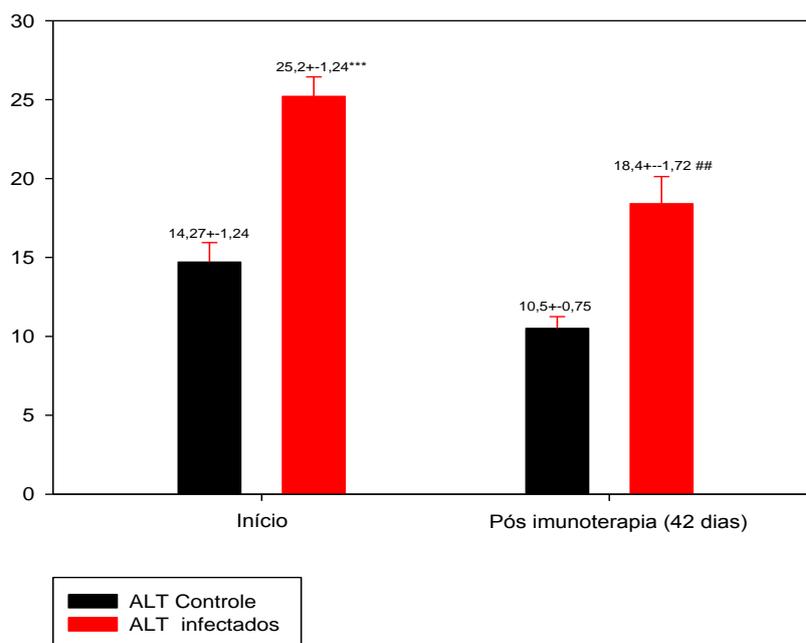


Diferenças estatisticamente significativa ** $P < 0.01$ (Grupos comparados com o grupo controle), ## $P < 0.01$ (Grupo “infectado” antes e pós imunoterapia).

Figura 6. Mensuração de IFN- γ , antes e após a imunoterapia, com aplicação do PitiumVac® a cada 14 dias.

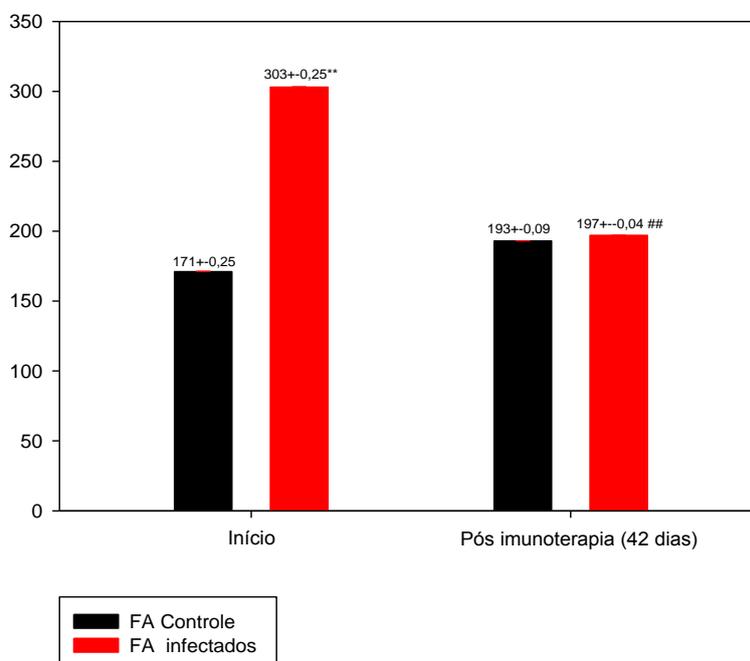
5.3 Avaliação bioquímica da função hepática

O estudo da função hepática (ALT, FA) dos animais do grupo infectado quando comparados aos animais do grupo controle, demonstraram diferença significativa ($P < 0.01$, $n=5$). Da mesma forma quando se comparou os animais do grupo infectado antes e depois do tratamento observou-se diferença significativa ($P < 0.01$, $n=5$), pelo teste de Bonferroni e teste múltiplos de Dunn (Figura 7 e 8).



Diferenças estatisticamente significativa *** $P < 0.01$ (Grupos comparados com o grupo controle), ## $P < 0.01$ (Grupo 2 “infectado” antes e pós imunoterapia).

Figura 7. Médias da enzima ALT observadas entre animais do (grupo 1) e animais (grupo 2), antes e depois a imunoterapia.



Diferenças estatisticamente significativa *** $P < 0.01$ (Grupos comparados com o grupo controle), ## $P < 0.01$ (Grupo 2 “infectado” antes e pós imunoterapia).

Figura 8. Médias da enzima FA observadas entre animais do (grupo 1) e animais (grupo 2), antes e depois a imunoterapia.

6. DISCUSSÃO

Acredita-se que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia baseiam-se principalmente na resposta celular.

Este fato é sustentado pelas alterações teciduais após o início da imunoterapia, com mudança de inflamação eosinofílica inicial para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T ao final da resposta. Possivelmente, os antígenos presentes no imunógeno induzam esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais (MENDOZA et al., 1996). Entretanto, THITITHANYANONT et al. (1998) sugeriram que a cura observada na imunoterapia poderia ser decorrente de uma mudança da resposta mediada pela subpopulação de linfócitos TH2 para uma resposta mediada pela subpopulação de linfócitos TH1. Observações posteriores reafirmam esta hipótese (MENDOZA et al., 2003; WANANACHIWANAWIN et al., 2004).

Apesar dos estudos sobre a doença e a imunoterapia, ainda não se postulou um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia e a interação entre *P. insidiosum* e o tecido vivo. O caráter progressivo da doença em equinos imunocompetentes sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio na resposta imunológica. Após o início da imunoterapia, ocorre uma modificação na inflamação eosinofílica inicial para uma resposta mononuclear, sendo os antígenos presentes no imunógeno os indutores desta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais (MENDOZA et al., 1996).

De acordo com Mendoza e Newton (2005) na infecção natural as hifas de *P. insidiosum* liberariam exoantígenos provocando uma resposta imune com subpopulações de linfócitos TH2. O inverso seria esperado com a imunoterapia com a liberação de antígenos citoplasmáticos ocorre a estimulação de uma resposta celular TH1 e sua posterior cura. As células TH2 podem suprimir a imunidade mediada por células através de uma sinalização que inibe a resposta TH1. As citocinas TH1 (IL-2 e IFN- γ), por sua vez, inibem reações ricas em eosinófilos (resposta TH2). Este tipo de balanço mantém a relação TH1/TH2 em um equilíbrio dinâmico, onde os dois tipos de resposta atuam simultaneamente e por fatores específicos uma resposta é mais evidenciado que outra.

Os resultados demonstram a diferença quantitativa da IL-2 e do IFN- γ no grupo dos animais infectados antes e depois do tratamento, mostrando uma elevação significativa dos níveis destas interleucinas após a imunoterapia. Estas duas citocinas são elementos

imunológicos que indicam que o tipo de resposta predominante é a Th1. A avaliação clínica mostrou de forma expressiva a regressão da lesão de pitiose e a melhora no quadro geral dos animais (80%), indicando que o aumento dos níveis de IL-2 e IFN- γ era acompanhado por uma melhora clínica significativa.

A sinalização para uma resposta TH1 está na dependência direta das células apresentadoras de antígenos (APC). Estas células interagem na resposta imune dependendo da quantidade e forma de apresentação dos antígenos. Esta apresentação não é um processo unidirecional, pois as células T, na medida em que são ativadas, liberam citocinas como o IFN- γ que potencializam ainda mais a função das APC (DONG C, 2006).

Na pitiose naturalmente adquirida a resposta imune se relaciona à inflamação eosinofílica, com estimulação de linfócitos TH2. Já na imunoterapia, os antígenos são apresentados de uma forma diferente pelas APC, provocando uma resposta imunológica distinta da infecção natural, com provável liberação de IL-12, a qual direciona o processo de diferenciação de linfócitos para TH1, produtores de IFN- γ . Com a resposta TH1 estabelecida ocorre maior produção de IL-2, responsável por proliferação clonal e IFN- γ , que ativa células mononucleares, como macrófagos, que por sua vez, danificam e destroem as hifas, promovendo a cura do hospedeiro (MENDOZA et al., 2003; MENDOZA e NEWTON, 2005; SANTURIO et al., 2006).

Para o controle da infecção granulomatosa, se faz necessário a predominância da resposta imune celular tipo TH1, envolvendo linfócitos TCD4+ e TCD8+ e citocinas como IL-2 e IFN- γ . Esta resposta tem como resultado a ativação de macrófagos, tornando-os capazes de eliminar e/ou controlar a infecção.

A quantidade de antígenos produzidos pela massa micelial macerrada ou liquidificada do imunoterápico liofilizado poderia estar amplificando a sinalização para o domínio da resposta TH1. De acordo com os resultados mostrados, a concentração de IFN- γ dos animais infectados no final do tratamento é estatisticamente superior ao início da imunoterapia, sugerindo que a cura clínica está vinculada com o aumento do IFN- γ produzido na resposta induzida pela imunoterapia.

Durante todo o decorrer da imunoterapia foi observado por exames clínicos que o PitiumVac[®] provocava algumas variações nos padrões fisiológicos dos animais e foi observado em 100% destes uma elevação da temperatura algumas horas após a aplicação do imunoterápico.

De acordo com os resultados encontrados, a leucocitose após a utilização da imunoterapia foi observada em todos os animais do grupo controle com aumento proporcional dos segmentados. Já no grupo dos animais com pitiose o leucograma teve uma significância estatística com o aumento de segmentados antes da imunoterapia. Todos os animais do grupo controle e do grupo com pitiose não apresentaram eosinofilia no início do estudo, mas apresentaram leve aumento dos eosinófilos após a aplicação do imunoterápico.

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima que está presente principalmente no fígado, nos ossos, no epitélio intestinal e placenta. Sua determinação é importante na avaliação dos distúrbios hepáticos e ósseos. É indicado quando se tem perda de peso, hepatomegalia, vômitos, diarreia, icterícia entre outros. Com exceção dos animais em crescimento, a elevada atividade sérica da FA aparece em patologias hepatobiliares. Podemos ter ainda aumento da fosfatase alcalina em osteomielites, certas neoplasias e granulomas (THRALL, 2007).

Os resultados demonstraram elevados níveis de FA em todos os animais com pitiose no início do tratamento e que após a imunoterapia ocorreu uma diminuição significativa dos valores da FA, acompanhado de uma melhora clínica, sugerindo que os 5 animais com pitiose apresentavam no início do tratamento uma alteração hepática, a qual no final da imunoterapia apresentou uma melhora satisfatória.

A grande totalidade das doenças hepáticas causam inicialmente sintomas leves então testes bioquímicos para determinação de FA são vitais para que estas doenças sejam detectadas precocemente. O envolvimento do fígado em algumas doenças pode ser de importância crucial. É importante citar que resultados anormais na função hepática podem refletir tanto distúrbios hepáticos primários quanto secundários. Doenças metabólicas, cardiovasculares e gastrintestinais são exemplos de sistemas orgânicos extra-hepáticos que podem causar alterações nos resultados dos testes (THOMASSIAN *et al.*, 2007).

O aumento da atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) indica uma lesão celular liberando-a para a circulação. Pequenos aumentos da sua atividade não têm relevância, pois o grau da lesão é responsável pelo aumento da atividade da ALT. Há lesões que permitem a passagem da enzima através da membrana sem perda de função celular; por exemplo, hipóxia decorrente de choque, doenças crônicas (THRALL, 2007).

Os resultados demonstram que antes do tratamento todos os animais com pitiose estavam com os níveis de ALT acima do normal, e após a imunoterapia ocorreu uma

diminuição da ALT e uma proporcional melhora no quadro clínico. A diferença estatística significativa das enzimas ALT e FA do grupo infectado antes e após a imunoterapia mostra que antes do tratamento os animais infectados estudados, apresentavam um quadro leve de alteração hepática e com o decorrer do tratamento os parâmetros da função hepática se normalizaram.

Os parâmetros imunológicos demonstraram uma mudança satisfatória frente à imunoterapia, a IL-2 e IFN- γ tiveram uma elevação quantitativa e proporcional à melhora clínica. Em contrapartida a ALT e FA diminuíram significativamente com as quatro aplicações do imunoterápico e no fim do 42^a dia de tratamento, a função hepática dos cinco equinos com pitiose (grupo 2) estava normalizada.

7. CONCLUSÕES

Os animais com pitiose clínica submetidos à imunoterapia com o PitiumVac[®], apresentaram um aumento significativo na produção de IL-2 e IFN- γ e demonstraram uma recuperação clínica satisfatória. Este resultado pode ser decorrente da interação distinta do antígeno presente no imunoterápico com o sistema imunológico, provocando o aumento na produção destas citocinas e estabelecendo um predomínio de resposta TH1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACKROYD, R. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

ARGENTA, J.S.; SANTURIO, S.H.; ALVES, S.H.; PERREIRA, D.I.B.; CAVALHEIRO, A.S.; SPANAMBER, A.; FERREIRO, L. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 2, p. 767-769, 2008.

AUSTWICK P.K.C.; COPLAND J.W. Swamp cancer. **Nature**. v. 250, p. 84, 1974.

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

BOTTON, S. A.; PEREIRA, D. I. B.; COSTA, M. M.; AZEVEDO, M. I.; ARGENTA, J. S.; JESUS, F. P. K.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J.M. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**, New York, v.62, n.4, p. 1225-1229, 2011.

BRIDGES, C.H; EMMONS, C.W. A phycomycosis of horses caused by *Hyphomyces destruens*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 138, n. 11, p. 579-589, 1961.

CALVANO, T.P; BLATZ,P.J; VENTO T.J; WICKES B.L; SUTTON D.A; THOMPSON E.H; WHITE C.E; RENZ E.M; HOSPENTHAL D.R; *Pythium aphanidermatum* Infection following Combat Trauma. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 49, p. 3710–3713, 2011.

CAVALHLEIRO, A.S., ZANETTE, R.A., SPADER, T.B., LOVATO, L., AZEVEDO, M.I., BOTTON, S., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M. In vitro activity of terbi-nafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metro-nidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol.** 137, 408–411, 2009.

CARVALHO, E. C. Q.; ROSA, C. A. R. R., CRUZ, L. C. H.; SCAFF, R. M. "Hyphomyces destruens": agente da "ferida brava" (hifomicose) em equinos do Pantanal de MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19º, 1984. Cuiabá. **Anais...**, p. 311.

CHETCHOTISAKD P.; PAIOROJKUL, C.; PORNTAVEEVUDHI, B.; SATHAPATAYAVONG, B.; MAIRIANG, P.; NUNTIROOJ, K.; PTJANASOONTORN, B.; SAEW, O.T.; CHAIPRASERT, K.; HASWELL-ELKINS, R. PA Human pythiosis in Srinagarind Hospital: one year's experience. **Journal of Medical Association of Thailand.** vol. 75, p. 248–254, 1992.

CURFS, J.A.H.J.; MÉIS, M.G.F.J.; HOOGKAMP-KORSTANJE, A. A. A primer on cytokines: souces, receptores, effects and inducers. **Clinical Microbiol Rev**, 742-780, 1997.

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

DONG C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. **Nat Rev Immunol.** V. 6, p. 329-33. 2006.

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

GOSBELL I.B. Cure of orthopaedic infection with *Scedosporium prolificans*, using voriconazole plus terbinafine, without the need for radical surgery. **Mycoses.** v. 46, n. 5-6, p. 233-266, 2003.

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

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

HENDRIX, J.W. Sterols in growth and reproduction of fungi. **Annual Review Phytopathology**. v. 8, p. 111-130, 1970.

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

KRAJAEJUN, T.; SATHAPATAYAVONGS, B.; CHAIPRASERT, A.; SRIMUANG, S. Do you know human pythiosis? **Journal of Infectious Disease Antimicrobial Agents**. v.25, n.1, p.45-51, 2008.

KWON-CHUNG, K.J. Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infections Diseases**. v. 19, suppl. (1), p. 1-7, 1994.

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

MCMULLAN, W.C.; JOYCE, J.R.; HANSELKA, D.V.; HEITMANN J.M. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 170, p. 1293-1297, 1977.

MEIRELES, M. C. A.; RIET-CORREA, F.; FISCHMAN, O.; ZAMBRANO, A. F. H.; ZAMBRANO, M. S. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**, Berlim, v. 36, p.139-142, 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.; ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**. v. 94, p. 123-129, 1986.

MENDOZA, L.; NICHOLSON, V.; PRESCOTT, J.F. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosum in horses. **Mycopathologia**. v. 119, 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.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**. v. 21, p. 2797-2804, 2003.

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

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

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

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

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

MOSBAH, E.; KARROUF, G.I.A.; YOUNIS, E.A.; SAAD, H. S.; AHDY, A.; ADEL, E.; ZAGHLOUL, A. E. Diagnosis and Surgical Management of Pythiosis in Draft Horses: Report of 33 Cases in Egypt. **Journal of Equine Veterinary Science**. P.1-6, 2011.

PARSLOW, Stites e Cols. **Imunologia Médica**, 10 ed, Editora Guanabara-Koogan. Capítulo 9, pág 113 a 126.2004

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

PEREIRA, D. I. B.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S.; H.; DE AZEVEDO, M. I.; SILVEIRA, F.; DA COSTA, F. F.; SALLIS, E. S. V.; POTTER, L.; FERREIRO, L. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 18, p. 129-133, 2008.

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

PESSOA, C.R.; CORREA, F; PIMENTEL, L.A; GARINO, F; DANTAS, A.F; KOMMERS, G.D; TABOSA, I.M; REIS-JÚNIOR, J.L. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **J Vet Diagn Invest**.v.6,p.1133-6. 2012.

PIRES, L.; BOSCO, S.M.G.; JUNIOR, N.F.S.; KURACHI C. Photodynamic therapy for pythiosis. **Veterinary Dermatology**. v. 24, p. 130,2013.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology. p. 279.1992.

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

RIVIERRE, C.; LAPRIE, C.; GUIARD-MARIGNY, O.; BERGEAUD, P.; BERTHELEMY, M.; GUILLOTT, J. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.11,p. 479-481, 2005.

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

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

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

SANTOS, M. N.; METZDORF, L. L.; BRAGA, M. M.; WOLLE, C. A. Pitiose cutânea em equinos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.7, n.3, p. 57-61, 1987.

SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, A. B.; LEAL, A. T.; KOMMERS, G. D.; DE SOUSA, R.S.; CATTO, J. B. Cutaneous Pythiosis insidiososi in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 141, p. 123-125, 1998.

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

SANTURIO, J.M. *Pythium insidiosum*: Avaliação de imuniterápico para eqüinos, utilizando-se coelhos como modelo experimental. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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

SANTURIO, J. M.; ARGENTA, J. A.; 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. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**, London, v. 163, p. 276–277, 2008.

SCHURKO, A. M.; MENDOZA, L.; DE COCK, A. W.; KLASSEN, G. R. Evidence for geographic clusters: molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia. Australia and the Americas are explored. **Mycologia**, New York, v. 95, p.200–208, 2003.

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

SHENEP, J.L. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Diseases**. v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

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

TABOSA, I. M.; RIET-CORREA, F.; NOBRE, V. M. T.; AZEVEDO, E. O.; REIS-JÚNIOR, J. L.; MEDEIROS, R. M. T. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 41, p.412-415, 2004.

TANPHAICHITRA D. Tropical disease in the immunocompromised host: melioidosis and pythiosis. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 11, suppl. 7, p. S1629–1643, 1989.

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

THOMASSIAN, A.; CARVALHO, F.; WATANABE, M. J.; SILVEIRA, V. F.; ALVES, A. L. G.; HUSSNI, C. A.; NICOLETTI, J. L. M. Atividades séricas da aspartato aminotransferase, creatina quinase e lactato desidrogenase de equínos submetidos ao teste padrão de exercício progressivo em esteira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 183-190, 2007.

THOMSON, A. **The Cytokine Handbook**, 4th edn. Academic Press. 2003.

THRALL, A. M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

TÚRY, E.; CORÔA A.C. Pitiose cutânea em equínos no Estado do Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXV, 1997, Gramado. **Annais...** Gramado, 1997. p.150.

VIRGILE, R.; PARDANANI, B.; PERRY, H. Human infectious corneal ulcer caused by *Pythium insidiosum*. **Cornea**. v. 12, p. 81–83, 1993.

WANACHIWANAWIN, W.; MENDOZA L.; VISUTHISAKCHAI, S.; MUTSIKAPAN, P.; SATHAPATAYAVONGS, B.; CHAIPRASERT, A. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**. v. 22, p. 3613–3621, 2004.

WEBSTER, J & WEBER, R.W.S. Introduction to fungi. In: **Introduction to Fungi**. Straminipila: Oomycota. Cambridge University Press. Cap 4 e 5, p.67-125. 2007.