

# **EFEITO DA ANFOTERICINA B, EXTRATO DA CASCA DE BARBATIMÃO, ÁCIDO TÂNICO PURIFICADO, DMSO E CORTICOSTERÓIDE NO TRATAMENTO DA PITIOSE EXPERIMENTAL EM COELHOS.**

**RODRIGO TROLEZI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microorganismos*.

*Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco*

**BOTUCATU – SP**

**2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EFEITO DA ANFOTERICINA B, EXTRATO DA CASCA DE BARBATIMÃO, ÁCIDO TÂNICO PURIFICADO, DMSO E CORTICOSTERÓIDE NO TRATAMENTO DA PITIOSE EXPERIMENTAL EM COELHOS.**

**RODRIGO TROLEZI**

**Orientador: SANDRA DE MORAES GIMENES BOSCO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microorganismos*.

*Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco*

**BOTUCATU – SP**

**2014**

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente agradeço aos meus pais, Marli e Luiz, que possibilitaram a minha formação e estão sempre ao meu lado, apoiando a realização de meus sonhos. Sem eles, não seria nada!*

*Ao Adilson, pelo apoio e dedicação durante todas as etapas experimentais e pela paciência e companheirismo nos momentos em que tudo parecia tão distante e por veras quase impossível;*

*A minha orientadora, Profa Sandra de Moraes Gimenes Bosco, pela amizade e confiança, como um apoio maternal, me guiando durante todas as etapas do projeto e auxiliando minha carreira profissional e meu crescimento pessoal;*

*A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por acreditar neste projeto, oferecendo apoio financeiro e bolsa de mestrado;*

*Aos meus colegas de laboratório pela amizade e companheirismo, e suporte nas etapas experimentais do projeto;*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por todo suporte acadêmico e sugestões pertinentes a pesquisa desenvolvida;*

*E a Deus, e minha crença religiosa, que possibilitou a busca por conforto e acalanto nos momentos em que tudo parecia desesperador, me permitindo acreditar e nunca desistir.*

## Sumário

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
1) Introdução .....	3
1.1) Filogenia e características do agente.....	4
1.2) Epidemiologia .....	6
1.3) Diagnóstico .....	11
1.4) Tratamento .....	12
2) Objetivos.....	17
3) Material e métodos.....	17
3.1) Aquisição dos compostos a serem utilizados nos tratamentos.....	17
3.1.1) Ácido tânico .....	17
3.1.2) Anfotericina B.....	18
3.1.3) Acetato de metilprednisolona .....	18
3.1.4) Dimetilsulfóxido (DMSO).....	18
3.1.5) Extrato da casca de barbatimão.....	18
3.2) Ensaio realizados.....	19
3.2.1) Produção dos zoósporos de <i>Pythium insidiosum</i> e inoculação em coelhos .....	19
3.2.2) Manutenção e eutanásia dos coelhos .....	21
3.2.3) Tratamentos.....	22
3.2.4) Avaliação da toxicidade dos compostos .....	23
3.2.5) Análise macroscópica e histopatológica das lesões .....	24
4) Resultados e discussão .....	25
4.1) Bloco 1 .....	27
4.2) Bloco 2.....	30
4.3) Bloco 3.....	33
4.4) Bloco 4.....	37
5) Conclusão.....	42
6) Referências Bibliográficas .....	43
7) Anexos .....	50

## RESUMO

A pitiose é uma doença causada pelo oomiceto denominado *Pythium insidiosum* e acomete animais domésticos, silvestres e o homem.

O tratamento de escolha é o procedimento cirúrgico, porém, dependendo da localização e extensão da lesão, é inviável e as recidivas são frequentes. Até o momento não há protocolos terapêuticos efetivos contra o agente, pois não há fármacos com eficácia comprovada *in vivo*.

Em virtude da gravidade e da ausência de tratamentos específicos, fazem-se necessárias pesquisas por novos protocolos terapêuticos.

Desta forma, avaliaram-se o efeito do extrato da casca de barbatimão, ácido tânico purificado, anfotericina B, DMSO e corticosteróide no tratamento da pitiose experimental em coelhos.

Foram utilizados um total de 21 coelhos, divididos em 6 diferentes protocolos terapêuticos e observou-se que não houve diferenças entre as formas de tratamento e o grupo controle.

Questiona-se o modelo experimental da pitiose, que é único na literatura. Em condições experimentais as lesões são diferentes das naturalmente adquiridas em cavalos e cães. Este modelo experimental talvez não seja o mais apropriado para a avaliação de novas formas de tratamento.

## ABSTRACT

Pythiosis is caused by the oomycete *Pythium insidiosum* and affects domestic and wild animals and man.

Treatment of choice for pythiosis is surgery, however, depending on the size and location of the lesion, it is an unfeasible procedure and relapses are frequently observed. Until this moment, there are no effective protocols for treatment, since there are no drugs with proved effectiveness *in vivo*.

Due to the severity and absence of specific treatment for pythiosis, new researches are necessary to search new compounds that can be used in therapeutic protocols.

So, it was evaluated the effect of bark extract of “barbatimão”, purified tannic acid, amphotericin B, DMSO and corticosteroid in the treatment of experimental pythiosis in rabbits.

It was evaluated 21 rabbits which were divided into six different therapeutic protocols and it was not observed differences among them and control group.

It is questioned the experimental model in rabbits, which is unique in literature. The lesions in this experimental model differ from that of natural condition in horses and dogs. This actual experimental model perhaps could not be suitable for new therapeutic protocols evaluation.

## 1) Introdução

A pitiose é uma doença que ocorre principalmente em países de clima tropical e subtropical e é causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* (MENDOZA et al., 1993). Pertence ao reino Stramenopila, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Peronosporales, família Pythiaceae e gênero *Pythium*. Tal gênero possui mais de 120 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo a maioria delas habitantes de solo e patógenos de plantas, acarretando grandes perdas econômicas na agricultura. A única espécie conhecida, até o momento, capaz de causar doença em animais, incluindo o homem, é o *Pythium insidiosum* (De COCK et al., 1987). Recentemente foi descrito um caso de pitiose humana em soldado combatente de guerra no Afeganistão, causada por *Pythium aphanidermatum*, fato este que sinaliza para a importância dos oomicetos na etiologia de doenças em animais (CALVANO et al., 2011).

A doença em geral caracteriza-se pela presença de lesões de aspecto granulomatoso em tecido cutâneo e subcutâneo e pode apresentar rápida evolução (PUPAIBOL et al., 2006). Afeta principalmente as espécies equina, canina e humana, nessa ordem. Em humanos, a doença ocorre com maior frequência na Tailândia, onde é endêmica principalmente em trabalhadores rurais de plantação de arroz, ambiente propício ao desenvolvimento do patógeno (TRISCOTT et al., 1993, PUPAIBOL et al., 2006).

O diagnóstico é difícil e normalmente, demorado, o que compromete o prognóstico da doença, pois a histopatologia frequentemente induz a diagnósticos errôneos, confundindo o patologista e o clínico com as zigomicoses (micoses causadas por fungos pertencentes ao reino Fungi, filo Zygomycota). Já a cultura requer pessoal treinado para reconhecer o patógeno em seus aspectos micológicos (KAUFFMAN, 1998). Técnicas sorológicas podem ser utilizadas, como por exemplo, o ELISA

(Enzyme linked immunosorbent assay) e a ID (imunodifusão), (MENDOZA et al., 1997). A imunohistoquímica é uma técnica específica também empregada no diagnóstico e recentemente a biologia molecular vem se constituindo em uma importante ferramenta para um diagnóstico específico e precoce (GROOTERS & GEE, 2002, BOSCO et al., 2005).

Até o momento não há tratamento efetivo para a pitiose. A intervenção cirúrgica é o procedimento de eleição, com retirada de margem cirúrgica, porém tal procedimento torna-se inviável dependendo da região anatômica acometida e da extensão da lesão. As recidivas são comuns e bons resultados são adquiridos apenas em pequenas lesões superficiais (MILLER, 1981). Diversos experimentos *in vitro* com fármacos antifúngicos, antibióticos e compostos fitoterápicos foram realizados objetivando averiguar sua ação frente o agente (PEREIRA et al., 2007, ARGENTA et al., 2008, LORETO et al., 2011, LORETO et al., 2012, ZANETTE et al., 2011) no entanto estudos *in vivo* são escassos (PEREIRA et al., 2007, LORETO et al., 2012).

Pesquisas que visem o descobrimento de novos fármacos com potencial uso terapêutico são extremamente bem-vindas e este tem sido o principal foco dos estudos com o patógeno nos últimos anos.

### **1.1) Filogenia e características do agente**

*Pythium insidiosum* pertence ao reino Stramenopila (compreende micro-organismos não fúngicos que apresentam características morfológicas e ecológicas semelhantes aos fungos do reino Fungi), classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae e gênero *Pythium*. Dentre as diversas características dos membros desta classe destacam-se a produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução



assexuada, talo diplóide e parede celular composta de beta glucana, celulose e hidroxiprolina (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos está retratada ao nível celular através de diferenças na composição da parede celular e da membrana plasmática. A quitina, componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente nos oomicetos, que apresentam como componentes predominantes celulose e beta-glucana. Ainda, o ergosterol não é o principal esteróide na membrana celular, como ocorre com os fungos. As espécies de *Pythium* possuem esteróides auxotróficos, ou seja, incorporam os esteróides do ambiente ao invés de os sintetizarem (GROOTERS, 2003).

A caracterização molecular e análise filogenética de um número significativo de isolados de *P. insidiosum* obtido de diferentes continentes (Ásia, Austrália e América) indicaram a existência de três *clusters* distintos. Esses estudos foram baseados na análise de digestão enzimática por técnicas de RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) da região intergênica (IGS) e os *clusters* obtidos são representados por três grupos: I – representados por isolados provenientes do continente americano, II – isolados da Ásia e Austrália e III – isolados de humanos da Tailândia e um dos Estados Unidos (SCHURKO et al., 2003). A separação desses isolados de *P. insidiosum* em *clusters* deram indícios de que espécies crípticas deste patógeno podem estar ocorrendo, a exemplo do que já foi descrito em patógenos fúngicos verdadeiros importantes, como *Histoplasma capsulatum* (KASUGA et al., 1999), *Coccidioides immitis* (KOUFOPANOU et al., 2001) e recentemente para *Paracoccidioides brasiliensis* (MATUTE et al., 2006, TEIXEIRA et al., 2013) e *Sporothrix schenckii* (MARIMOM et al., 2007, LOPEZ-ROMERO et al., 2011).

KAMMARNJESADAKUL et al. 2011 realizaram análises filogenéticas, baseada nas regiões ITS do rDNA (Internal Transcribed Spacer) e da citocromo oxidase (Cox II, DNA mitocondrial), de diferentes isolados de *P. insidiosum*, obtidos do ambiente e de pacientes tailandeses, e observaram que em relação ao gene da Cox II houve agrupamento de três *clusters*, A, B e C, sendo o mesmo observado nas análises do ITS. Entretanto, o gene Cox II permitiu melhor distinção entre os isolados dos clusters B e C quando comparados com a região ITS. Os autores concluem que as análises baseadas no gene da Cox II permitem melhor separação em nível intraespecífico.

AZEVEDO et al. (2012) realizaram análises filogenéticas com isolados de *P. insidiosum* provenientes do Brasil (região centro-oeste e sul), bem como incorporaram sequencias, dessas regiões gênicas, de isolados dos EUA, Costa Rica e Tailândia, obtidas do GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). Foi observado, semelhantemente aos resultados de KAMMARNJESADAKUL et al. (2011), que a árvore filogenética obtida pela análise do gene Cox II permitiu melhor resolução intraespecífica quando comparada à região ITS.

## **1.2) Epidemiologia**

*Pythium insidiosum* é um agente colonizador de plantas aquáticas que se reproduz assexuadamente através da produção de esporângios que, maduros, rompem-se e liberam zoósporos biflagelados no meio aquático, os quais correspondem à forma infectante do patógeno. Estes, livres, movimentam-se até encontrar outra planta ou animal com tecido injuriado, onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a uma nova hifa, que induz o aparecimento das lesões (MENDOZA et al.,

1993). É questionável a possibilidade da penetração dos zoósporos a partir da pele íntegra, sendo atraídos pelo folículo piloso (SANTURIO et al., 1998).

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical e subtropical, tendo sido relatada principalmente nos continentes americano e asiático (MENDOZA et al., 1993, TRISCOTT, 1993). Não há predisposição sexual, racial ou por faixa etária. A fonte de infecção são os zoósporos presentes no ambiente aquático e não há relatos de transmissão direta entre indivíduos acometidos (MENDOZA et al., 1996).

Esta doença é também conhecida como hifomicose, granuloma ficomicótico, “swamp cancer” (nos Estados Unidos) e “ferida da moda” (na região do pantanal Matogrossense brasileiro). Tais denominações em sua maioria referem-se à pitiose equina. Pela presença recorrente em regiões com acúmulo de água, o equino é a espécie mais acometida pela doença no mundo, especificamente na região do Pantanal Matogrossense (SANTURIO et al., 2006, GAASTRA et al., 2010).

Nos equinos, as lesões cutâneas são as mais frequentes, acometendo principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toraco-abdominal (GAASTRA et al., 2010).

Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando massas com bordas irregulares. Há presença de hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas denominadas “kunkers”. Secreções serossanguinolenta, mucossanguinolenta, hemorrágica ou mucopurulenta podem fluir através dos *sinus* da lesão. Devido ao intenso prurido, normalmente são visíveis sinais de mutilação no local da lesão e quando se compromete membros, observa-se claudicação. A forma intestinal também pode estar presente e os animais acometidos

apresentam episódios de cólica devido à obstrução do lúmen intestinal (REIS et al., 2003; SANTURIO & FERREIRO, 2008).

Ainda, outros órgãos e tecidos podem ser acometidos secundariamente, como o comprometimento de ossos adjacentes às lesões cutâneas crônicas, caracterizadas no exame radiológico por exostoses, osteólises e osteomielite (SANTURIO & FERREIRO, 2008).

REIS et al. (2003) relataram três casos de pitiose equina com disseminação sistêmica a partir de uma lesão subcutânea. Em geral, nos achados de necropsia, foram encontradas lesões granulomatosas multifocais e encapsuladas no fígado, pulmão e baço, com presença de hifas do patógeno. Tal disseminação pode ser possível nos casos crônicos da doença e foi constatada através de análise específica, incluindo reação de amplificação de gene 18S da região do DNA ribossomal.

Os cães correspondem à segunda espécie animal mais acometida pela pitiose, podendo ser encontrada na forma cutânea e mais comumente na forma gastrointestinal, apresentando distúrbios digestivos como anorexia, emese, diarreia, perda de peso. À palpação abdominal, muitas vezes, é possível constatar a presença de massas nodulares (GROOTERS, 2003). Em geral, estes animais são oriundos de zonas rurais ou permaneceram por um período de tempo em locais alagados (DYKSTRA et al., 1999).

As lesões caracterizam-se por formação de grandes massas na parede do trato gastrointestinal, compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose e intenso infiltrado eosinofílico, além de presença de hifas (GAASTRA et al., 2010).

A forma cutânea-subcutânea também pode ser observada nos cães. Lesões cutâneas têm sido relatadas principalmente na região lombo-sacra, região esta

frequentemente lesionada nos cães que apresentam predisposição à DASP (Dermatite Alérgica a Saliva da Pulga). Dessa forma, ocorrem pequenos traumas no tecido cutâneo, os quais servem de porta de entrada para a penetração dos zoósporos.

Relatos de pitiose canina gastrentestinal são comuns no Brasil, já para a pitiose cutânea-subcutânea existem 3 relatos. O primeiro caso foi descrito por LARSON et al. (1997) em uma cadela proveniente do estado de São Paulo que apresentava lesão em membro posterior. O segundo caso foi descrito por TORRES NETO et al. (2010), em uma fêmea, também do estado de São Paulo, que apresentava comprometimento em região lombo-sacra. O terceiro caso envolvendo lesão cutânea subcutânea foi descrito no estado do Rio Grande do Sul em uma fêmea que apresentou, além da lesão cutânea em lateral de tórax, o envolvimento do trato gastrentestinal, sendo este o único relato que demonstra o envolvimento concomitante de lesão cutânea e gastrintestinal em cão (PEREIRA et al., 2010).

A pitiose em gatos é rara, ocorrendo poucos casos nos Estados Unidos e as manifestações clínicas incluem lesões retrobulbares e manifestações gastrintestinais (BISSONNETTE et al., 1991, RAKICH et al., 2005). Até o momento nenhum caso de pitiose felina foi relatado no Brasil.

A pitiose em ruminantes já foi descrita sob a forma de surto tanto em ovinos quanto bovinos. TABOSA et al. (2004) relataram surtos em dois rebanhos distintos no estado da Paraíba, um deles envolveu 40 animais, de um total de 120 e no outro houve o acometimento de seis animais de um total de 80. No geral, observaram-se lesões ulceradas nos membros e abdome. Nos achados de necropsia de três animais foi constatada metástase pulmonar caracterizada por nódulos multifocais e em um deles, a lesão cutânea atingiu o osso sesamóide. No exame microscópico foi detectada a

presença de granulomas multifocais contendo hifas de *P. insidiosum*. O diagnóstico foi baseado na análise histopatológica, imunohistoquímica e cultura do agente etiológico.

SANTURIO et al. (2008) relataram quatro casos de rinite granulomatosa em ovelhas da raça Santa Inês. Dois animais morreram subitamente após curso de 28 dias da doença e os outros dois foram submetidos a eutanásia após 50 dias de evolução da doença devido ao intenso comprometimento respiratório superior. O diagnóstico foi confirmado por biologia molecular e este relato evidencia a importância de se fazer um diagnóstico correto e precoce, uma vez que os ovinos também apresentam rinite granulomatosa por *Conidiobolus lamprauges*, um fungo pertencente ao Filo Zygomycota, ordem Entomophthorales.

Em animais selvagens, a literatura sobre a ocorrência de *P. insidiosum* é bem recente, sendo relatado caso de pitiose abdominal em tigre de bengala (BUERGELT et al., 2006), lesões em face e estômago em dromedário (WELLEHAN et al., 2004), lesões em vulva em camelos (VIDELA et al., 2011) e lesão subcutânea em ave (PESAVENTO et al., 2008). As características das lesões assemelham-se as descritas anteriormente e estes animais habitavam locais que propiciavam o ciclo reprodutivo do patógeno.

No homem, a doença é comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, podendo também ser encontrada nas Américas e Oceania, manifestando lesões cutâneas e subcutâneas de natureza granulomatosa ou mesmo lesões oculares, como ceratites e úlceras de córnea. Outra manifestação clínica da doença humana é a sistêmica ou vascular, considerada a de maior gravidade por resultar na oclusão dos vasos e/ou aneurisma (TRISCOTT et al., 1993, PUPAIBOL et al., 2006). Na Tailândia a pitiose humana é fortemente associada à talassemia, um tipo de anemia geneticamente codificada que faz com que os pacientes apresentem níveis séricos de ferro mais

elevados. A influência do ferro na patogênese da pitiose experimental já foi demonstrada por ZANETTE et al. (2012) que verificaram haver correlação entre o tamanho das lesões em coelhos e os altos níveis de ferro.

Apesar de a pitiose ser comum em equinos e cães no Brasil, a doença em humanos foi recentemente relatada, correspondendo ao primeiro e único caso até então descrito na literatura. Trata-se de um paciente, proveniente do estado de São Paulo, que desenvolveu lesão em membro inferior, após realizar atividade de pesca. O diagnóstico definitivo de pitiose foi concluído somente após o sequenciamento da região ITS-5.8S do rDNA da cultura obtida a partir dos fragmentos da lesão (BOSCO et al., 2005, MARQUES et al., 2006).

### **1.3) Diagnóstico**

O diagnóstico da pitiose é tradicionalmente baseado na associação das manifestações clínicas com exames histopatológicos e isolamento do agente (GAASTRA et al., 2010).

Em cortes histológicos, observa-se que *P. insidiosum* cora-se bem pelas técnicas de Gomori-Grocott e PAS (Periodic Acid of Schiff), evidenciando hifas largas, ramificadas e esparsamente septadas, características comuns também de fungos zigomicetos (KAUFFMAN, 1998). Os “kunkers” apresentam-se como concreções eosinofílicas de tamanho variado e forma circular com contornos irregulares, e são vistos apenas nos equinos (KAUFFMAN, 1998).

O isolamento do agente pode ser realizado através da cultura de “kunkers” ou tecido infectado em Ágar Sabouraud. Estes devem ser previamente colocados em solução contendo antibiótico (por exemplo, cloranfenicol na concentração de 50

µg/mL), para minimizar contaminação bacteriana. O crescimento típico é observado cerca de 24 horas após o cultivo a 37°C, e a identificação de *P. insidiosum* é feita por meio de aspecto macroscópico da colônia, característica das hifas e produção dos esporângios e zoósporos em meio adequado (GROOTERS, 2003).

A imunohistoquímica e a sorologia, como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e ID (Imunodifusão), são técnicas complementares para auxiliarem no estabelecimento do diagnóstico, principalmente quando não é possível a obtenção do patógeno em cultura (MENDOZA et al., 1996).

Técnicas de biologia molecular, como a Nested-PCR empregando-se *primers* específicos para detecção de *P. insidiosum* e o sequenciamento gênico a partir da amplificação do DNA ribossomal, região ITS1-5.8S-ITS2, também são consideradas importantes ferramentas para detecção e identificação de *P. insidiosum* e vêm se mostrando promissoras para o diagnóstico da pitiose (GROOTERS & GEE, 2002).

#### **1.4) Tratamento**

Em geral, a intervenção cirúrgica é o procedimento de eleição, entretanto, há grande possibilidade de recidivas (MILLER, 1981).

A imunoterapia tem sido estudada como tratamento alternativo nos casos de pitiose. Duas formulações de vacinas foram desenvolvidas e comparadas, uma tendo como antígeno a massa celular e outra um antígeno solúvel concentrado. Ambas apresentaram cerca de 60% de eficácia em cavalos com lesões adquiridas em menos de dois meses (MENDOZA et. al, 1992). Apesar disso, não há conhecimento completo dos mecanismos envolvidos na infecção por *P. insidiosum*. As explicações para a cura induzida pela imunoterapia são apenas propostas baseadas em características clínicas.



Segundo MILLER (1981), as hifas do patógeno não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro devido à extensa reação inflamatória (MILLER, 1981). Segundo MENDOZA et al. (1996) a resposta celular parece ser o principal mecanismo envolvido na cura da doença. Na patogenia das lesões da pitiose equina observa-se que existe o predomínio de uma reação eosinofílica, a qual é originária da secreção de exoantígenos pela hifa do patógeno no tecido, estimulando a liberação de interleucina-4 (IL-4) que induz a diferenciação de linfócitos para o padrão T *helper* 2 (Th2). Os antígenos presentes no imunógeno induzem a mudança de resposta imunológica com predomínio de células mononucleares e perfil Th1, a qual estimula a produção de interleucina-2 e interferon-gama, ativando macrófagos e IgG, resultando na ativação do sistema complemento e destruição do patógeno (MENDOZA et. al., 1996).

Por diferir estruturalmente dos fungos verdadeiros (ALEXOPOULOS, 1996), o tratamento com antifúngicos convencionais não se mostra muito efetivo contra o *P. insidiosum*, quando usados isoladamente.

O uso da terbinafina associada à anfotericina B, fluvastatina, rifampicina, metronizadol e ibuprofeno foi utilizado por CAVALHEIRO et al. (2009a), em pesquisa *in vitro* envolvendo a zoosporogênese de *P. insidiosum*. Os mesmos autores testaram também seu efeito sinérgico com a caspofungina, miconazol, fluconazol e cetoconazol (CAVALHEIRO et al., 2009b). Em ambos os experimentos, todos os fármacos foram também testados individualmente, para efeito comparativo. Individualmente, os fármacos não antifúngicos apresentaram resultados mais promissores, com uma concentração inibitória mínima (MIC) menor. Foi observado sinergismo no uso associado da terbinafina a anfotericina B, com uma concentração inibitória em 8mg/L, quando isolados apresentavam MIC de aproximadamente 32mg/L. Há também grande sinergismo entre a terbinafina e fluconazol, com resultados similares a anfotericina B ou

terbinafina e caspofungina, com valores um pouco superiores. Fora observado efeito antagônico quando associada à fluvastatina e rifampicina. As demais associações não demonstraram valores significativos quando comparado ao seu uso individual.

ARGENTA et al. (2012), induziram experimentalmente a pitiose em coelhos e realizaram pesquisas envolvendo o uso combinado de dois ou três dentre os seguintes fármacos: terbinafina, itraconazol, caspofungina e fluvastatina. O intuito era de observar e correlacionar com os resultados obtidos *in vitro* em outro experimento. Foram 4 grupos testados: terbinafina e itraconazol; terbinafina, itraconazol e fluvastatina; terbinafina e caspofungina; controle. O maior efeito sinérgico foi observado na associação das três medicações, porém os resultados indicaram, mais uma vez, *in vivo*, apenas efeito fungistático, sem alterações ao exame histopatológico, quando comparado ao grupo controle. Os autores ressaltaram que, a associação tripla deve ser investigada quando do seu uso em humanos, uma vez que não há nada descrito sobre efeitos tóxicos quando administradas em conjunto.

Observou-se crescimento paradoxal do *P. insidiosum* quando na presença da caspofungina isoladamente. Concentrações inferiores ou iguais a 32 µg/mL foram responsáveis por inibir o desenvolvimento do patógeno, porém concentrações superiores acabaram favorecendo seu desenvolvimento, quando comparado ao grupo controle. Estes resultados assemelharam-se aos observados em estudos envolvendo espécies de *Candida* e *Aspergillus*. O motivo pelo qual isso ocorreu ainda não foi totalmente descrito, porém acredita-se que altas concentrações de caspofungina acabem por estimular a produção de quitina nos fungos. Já em *P. insidiosum*, os pesquisadores atribuíram tal fato a maior produção de celulose. Este efeito não é observado corriqueiramente (ARGENTA et al, 2010). CAVALHEIRO et al. (2009b), em estudo

com o mesmo componente, não observaram tal característica mesmo em concentrações de 64 µg/mL.

PEREIRA et al. (2007) realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo* com a caspofungina e observaram que a caspofungina exerceu efeito fungistático sobre *P. insidiosum*. Isso ficou bem claro ao se verificar que durante o tratamento as lesões nos coelhos experimentalmente infectados diminuíram de tamanho, no entanto cresceram rapidamente quando a caspofungina não foi mais administrada.

Além de medicações antifúngicas, foram também avaliadas medicações antibacterianas no desenvolvimento *in vitro* do patógeno. LORETO et al. (2011) realizaram pesquisas *in vitro* envolvendo o uso de antibióticos da família das tetraciclina e macrolídeos na tentativa de averiguar sua eficácia contra zoósporos de *P. insidiosum*, através da técnica de microdiluição em caldo. O mecanismo de ação das mesmas ainda não foi totalmente esclarecido, mas atuam inibindo a síntese proteica. Foram testados antimicrobianos do grupo dos macrolídeos (eritromicina, azitromicina, claritromicina) e tetraciclina (minociclina, tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina). Em todas, foram observadas inibição satisfatória do agente, com destaque para a minociclina, seguida da doxiciclina, com concentrações inibitórias médias de 2 mg/L e 8 mg/L respectivamente. Os autores são enfáticos ao indicar que, *in vitro*, tais resultados destacaram-se dentre outros fármacos, como os antifúngicos convencionais, porém seu uso *in vivo* ainda não foi averiguado.

Esse mesmo grupo de pesquisadores avaliaram a eficácia do composto denominado Diphenyl-diselenide sobre o desenvolvimento *in vitro* de dezenove isolados de *P. insidiosum*. A inibição de 100% da transformação dos zoósporos em micélio foi observada na concentração de 2 mg/L. Os autores trabalharam também com

a indução experimental da pitiose em coelhos e estabeleceram um protocolo diário administrando 10 mg/kg do referido composto durante 40 dias em cinco animais. Os resultados satisfatórios observados *in vitro* não apresentaram repetibilidade nos estudos *in vivo* e os autores chegaram a conclusão de que, apesar da ausência de toxicidade do Diphenyl-diselenide, o mesmo atua de forma fungistática retardando a evolução da doença apenas nos primeiros dias de administração (LORETO et al, 2012).

Produtos naturais também são comumente utilizados em testes para a busca de novos compostos com potencial uso terapêutico. Recentemente, uma planta medicinal da família da Apocynaceae, *Alyxia schlechteri*, foi utilizada por estudiosos da Tailândia. Dez componentes presentes nas raízes de tal planta foram isolados e testados individualmente a fim de observar sua atuação frente a micélios de *P. insidiosum*, através da técnica de difusão de disco. Três destes componentes, denominados 3, 4 e 5 ésteres mostraram resultados eficazes, com inibição de halo de crescimento médio de 15 mm. Os autores atribuem tal resultado a presença de ligantes em determinadas cadeias de carbono que se destacam dentre os dez ésteres e que podem atuar de forma deletéria sobre as hifas do patógeno (SRIPHANA et al, 2013a). Ainda, estudo semelhante foi realizado por um grupo de pesquisadores, com um alcaloide denominado Clauraila E, obtido de raízes da planta *Clausena harmandiana*. Tal isolado apresenta nove compostos, que foram testados individualmente. Observaram-se inibição de halo de crescimento médio de 12 mm, nos compostos 3, 6, 7 e 9. Estudos mais detalhados sobre tais compostos estão sendo realizados, para que possam determinar o mecanismo de ação dos mesmos (SRIPHANA et al, 2013b).

KRAJAEJUM et al. (2012) observaram o efeito de compostos orgânicos voláteis obtidos pelo *Musdocor crispans*, um fungo endofítico que já foi comprovado ter ação antimicrobiana contra uma ampla variedade de patógenos humanos e de plantas,

incluindo os oomicetos. Como resultado, observou-se que os 30 isolados de *P. insidiosum* testados apresentaram inibição do crescimento radial das hifas e esta inibição foi mais evidente quando se utilizou volume de 20 µL do composto volátil.

ZANETTE et al. (2011) avaliaram o efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) contra 17 isolados de *P. insidiosum* e observaram que todos os isolados foram inibidos em concentrações variando de 0,39 a 6,25 mg/mL.

Apesar das crescentes pesquisas em torno deste agente, o sucesso observado *in vitro* ainda não foi satisfatório quando aplicado *in vivo*. Talvez o modelo experimental utilizado até o momento (e único) seja o grande desafio das pesquisas, uma vez que a doença tende a se portar de forma diferente das observadas em animais naturalmente infectados, pois nos coelhos há presença de espessa capsula fibrosa que dificulta a perfusão de qualquer composto.

## **2) Objetivos**

Avaliar o efeito do ácido tânico, extrato da casca de barbatimão, anfotericina B, DMSO e corticosteróide, por diferentes vias de administração, no tratamento da pitiose experimental em coelhos.

## **3) Material e métodos**

### **3.1) Aquisição dos compostos a serem utilizados nos tratamentos**

#### **3.1.1) Ácido tânico**

O ácido tânico utilizado nos ensaios foi o da Sigma-Aldrich (no. Catálogo 16201), veiculado em forma de pó. Para a utilização como tratamento foi diluído em água destilada estéril, em concentração de 100 mg/mL.

### **3.1.2) Anfotericina B**

A Anfotericina B foi adquirida comercialmente (ANFORICIN B®, Cristália, 50mg) e diluída em veículo próprio em volume de 10 mL.

### **3.1.3) Acetato de metilprednisolona**

O Acetato de metilprednisolona foi adquirido comercialmente (PREDI-MEDROL®, União Química, 40mg/mL).

### **3.1.4) Dimetilsulfóxido (DMSO)**

O DMSO foi adquirido comercialmente (DIMESOL®, Marcolab, 100 mL). Neste experimento, utilizou-se DMSO a 10%. Para isso, 10 mL do produto foram diluídos em 90 mL de soro fisiológico, como prescrito pelo fabricante.

### **3.1.5) Extrato da casca de barbatimão**

As amostras da casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) foram coletadas no período da manhã, no distrito de Rubião Jr, próximo ao Campus da UNESP/Botucatu. A respectiva exsicata, sob número 026633 BOTU, permanece no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências – IBB, UNESP Campus de Botucatu.

Para a obtenção do extrato, as cascas do barbatimão foram secas em estufa de circulação forçada de ar à temperatura média de 50 °C, realizando-se pesagens diárias até obtenção de peso constante. Posteriormente foram trituradas em moedor mecânico.

Acrescentou-se solução de metanol a 70% nas cascas trituradas e a mistura foi mantida em câmara fria, com temperatura média de 4°C, para o processo de extração. Após um período de 48 horas realizou-se o primeiro processo de filtração, em papel de filtro Whatman. Ao material retido no filtro adicionou-se um litro de metanol 70% e manteve-se a 4°C por 24h, período o qual foi realizado a segunda filtração. Posteriormente, o filtrado foi submetido ao processo de evaporação do solvente em evaporador rotativo, com temperatura do banho de água ao redor de 45 °C (BETONI et al., 2006).

Para a determinação do peso seco de cada extrato foi utilizado 5 repetições, dispondo de alíquotas de 1 mL em cubetas de alumínio. Estas alíquotas permaneceram em manta de aquecimento para evaporação do extrato, sendo os seus respectivos pesos acompanhados até pesagem constante, segundo metodologia adaptada de BETONI et al. (2006).

### **3.2) Ensaio realizados**

#### **3.2.1) Produção dos zoósporos de *Pythium insidiosum* e inoculação em coelhos**

Para a produção de zoósporos empregou-se o isolado Eq-16, que na época do início dos experimentos era o isolado mais recente de *P. insidiosum*. Este isolado foi utilizado em todos os testes de inoculação experimental.

Para tanto, seguiu-se o protocolo descrito por MENDOZA & PRENDAS (1988), com algumas modificações: o patógeno foi inicialmente cultivado em ágar Sabouraud (SAB) 4% por 24 h a 37°C, após cultivado em SAB 2% por 24 h a 37°C e depois desse período foram cortados blocos de Agar com crescimento do patógeno, os quais foram transferidos para placas contendo agar água 2% e sobre os blocos foram adicionadas

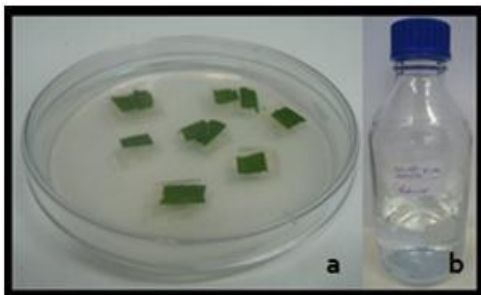
folhas de gramíneas, previamente higienizadas e autoclavadas. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C a fim de se obter o parasitismo das gramíneas e passado esse tempo as folhas parasitadas foram colocadas em meio líquido de indução\* e mantidas a 37°C por um período de 7 h para a produção de zoósporos.

\* Solução A:  $K_2HPO_4$  (1,0 M),  $KH_2PO_4$  (1,0 M),  $(NH_4)_2HPO_4$  (3,66 M),

Solução B:  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,5 M),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,5 M).

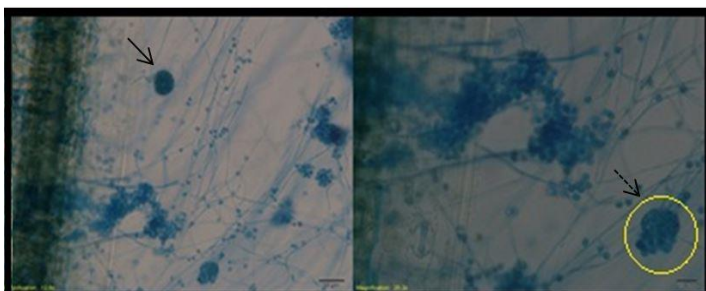
O Meio de Indução foi obtido pela mistura de 0,5mL da solução A e 0,1mL da solução B em 1000mL de água destilada estéril.

Na **Figura 1a** podem ser observados os fragmentos de gramíneas depositados sobre os blocos de agar SAB 2% contendo *P. insidiosum*.



**Figura 1:** Placa de Petri com agar-água 2% contendo blocos de Agar Sabouraud a 2% com crescimento do patógeno e gramíneas para serem parasitadas (a). Meio líquido de indução para a produção dos zoósporos (b). Após 24h em estufa, estas gramíneas, então parasitadas, foram submersas em placas contendo meio líquido de indução.

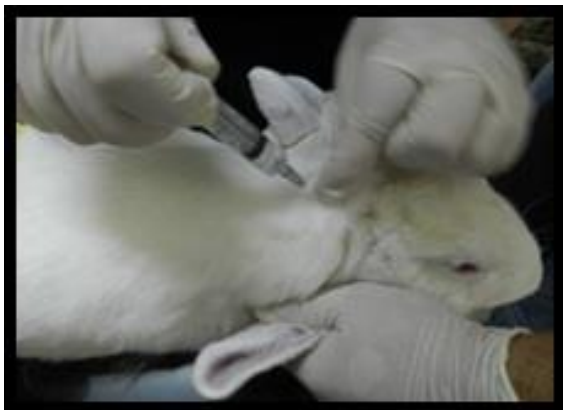
A produção de zoósporos foi avaliada em estereomicroscópio (Stereo Discovery.V20 - Zeiss) visando observar a presença de esporângios e os zoósporos em seu interior. Na **Figura 2** podem ser observadas lâminas preparadas com lactofenol azul algodão de gramíneas parasitadas, evidenciando esporângios repletos de zoósporos.



**Figura 2:** Gramínea com hifas de *P. insidiosum*, em meio de indução, em aumento de 20X (à esquerda) e 40X. A seta mostra esporângio de *P. insidiosum* e a seta tracejada (em destaque), esporângio sendo rompido e liberando zoósporos. Coloração lactofenol azul-algodão.



A inoculação foi feita uma única vez, por via subcutânea em região dorsal, (próximo à nuca), em volume de 2,0 mL de meio líquido de indução contendo os zoósporos (**Figura 3**).



**Figura 3:** Inoculação subcutânea de meio de indução contendo zoósporos na região cervical, próxima à nuca, em coelho da raça Botucatu.

### 3.2.2) Manutenção e eutanásia dos coelhos

Foram utilizados 21 coelhos da raça Botucatu com idade entre três a quatro meses, de ambos os sexos, obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Foram mantidos individualmente no Biotério dos Departamentos de Microbiologia-Imunologia e Parasitologia, do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, em gaiolas com água e alimentação *ad libitum* e limpeza 3 vezes por semana, respeitando-se os períodos de claro/escuro (12h/12h, respectivamente).

Após o período determinado para avaliação dos diversos tratamentos, foram submetidos ao procedimento de eutanásia a partir da administração de Zoletil® (Virbac, 0,2 mL/Kg) e após observação de plano anestésico, aplicação de cloreto de potássio por via intravenosa.

No **Anexo 1** pode ser observado a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IBB) para a realização dos ensaios com coelhos.

### **3.2.3) Tratamentos**

Os animais foram divididos em grupo controle e em diversos grupos de tratamentos, contendo cada grupo 3 animais. Os estudos foram iniciados quando as lesões atingiram cerca de 5 cm de diâmetro e duraram 60 dias.

Os estudos foram divididos em blocos e realizados em períodos distintos:

#### **Bloco 1**

**G1:** Administração de água destilada estéril, por via intralesional, a cada 48h (grupo controle).

**T1:** Administração de ácido tânico via intralesional na concentração de 15 mg/mL, a cada 48 horas.

**T2:** Administração de ácido tânico via intralesional na concentração de 30 mg/mL, a cada 48 horas.

#### **Bloco 2:**

**T3:** Administração de Anfotericina B (0,8 mL), por via intravenosa, contendo 4 mg da droga.

#### **Bloco 3:**

**T4:** Administração de 1,5 mL (60 mg) de ácido tânico por via oral, diariamente.

**T5:** Administração de 1,5mL (195 mg) de extrato da casca de barbatimão por via oral, diariamente.

## **Bloco 4**

**T6:** Administração de acetato de metilprednisolona, por via intramuscular, semanalmente e ácido tânico purificado com DMSO, por via intralesional, a cada 48h.

Para o grupo controle dos blocos 2, 3 e 4 foram utilizados os resultados das medidas dos diâmetros da lesão dos animais pertencentes ao G1, com o intuito de utilizar o menor numero de animais possíveis no estudo.

### **3.2.4) Avaliação da toxicidade dos compostos**

Foram realizados testes de toxicidade para o ácido tânico e o extrato da casca de barbatimão, quando empregados por via oral. Estes estudos foram realizados adotando-se protocolo de avaliação de toxicidade descrito por LOOMIS (1996). Segundo LOOMIS (1996), um composto é considerado extremamente tóxico quando em concentração de 5g/kg, em dose única, é capaz de causar letalidade em 50% da população. Ainda segundo o autor, tal metodologia substitui a metodologia clássica para testes de toxicidades, a qual envolve um grande numero de indivíduos (LOOMIS et. al, 1996).

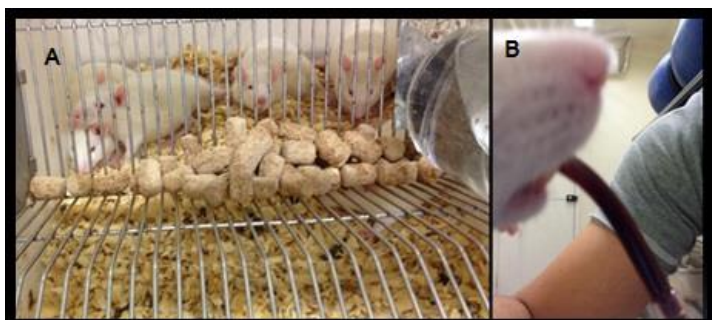
Para a realização deste estudo, 15 ratos da raça Wistar, de ambos os sexos, com aproximadamente 2 meses de idade, foram divididos em 3 grupos e receberam em dose única, por gavagem, os seguintes compostos:

**Controle (n=5):** 1mL de água destilada estéril

**Ácido Tânico (n=5):** 5g/kg do tanino

**Extrato de barbatimão (n=5):** 5g/kg do extrato

Todos os animais foram observados por um período de 5 dias, para averiguar a toxicidade aguda. Na **Figura 4** pode ser observado como foi feita a administração do extrato da casca do barbatimão por gavagem em rato.



**Figura 4:** Ratos utilizados no teste de toxicidade (A) animais armazenados em caixa, contendo maravalha e disponibilidade de alimento e água *ad libidum* (B) detalhe da administração do extrato da casca de barbatimão, por meio de gavagem, em um dos ratos.

No **Anexo 2** pode ser observado a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IBB) para a realização dos ensaios com ratos.

Para os coelhos tratados, foram realizados exames clínicos e laboratoriais (hemograma completo e dosagem de glicemia além de bioquímico sérico de ALT, AST, glutamato desidrogenase, GGT, uréia, creatinina e albumina) no início e ao fim de cada tratamento a fim de averiguar possíveis alterações funcionais em decorrência da doença e efeito tóxico, provenientes da administração dos tratamentos.

### **3.2.5) Análise macroscópica e histopatológica das lesões**

Durante todo o período de tratamento, foram realizadas análises macroscópicas das lesões, por meio de inspeção visual, palpação e mensuração do diâmetro com paquímetro (**Figura 5**), a fim de se comparar a variação no diâmetro das lesões com os diferentes tratamentos.



**Figura 5:** Avaliação da medida da lesão com auxílio do paquímetro.

Após a realização da necropsia, fragmentos das lesões foram coletados e armazenados em formaldeído 10%, para análises histopatológicas. Nos cortes histológicos, foram empregadas as colorações de hematoxilina-eosina (HE) a fim de se observar a resposta inflamatória, assim como danos causados ao tecido e a coloração de Periodic acid-Schiff (PAS) para melhor observação das hifas do patógeno, quando necessário.

Quando os animais foram submetidos ao tratamento oral com extrato de barbatimão e tanino, fragmentos de tecido gástrico e hepático foram coletados, para averiguar lesões em decorrência da administração destes compostos.

#### **4) Resultados e discussão**

Todos os protocolos terapêuticos foram iniciados transcorridos vinte dias da indução. A evolução da doença, nos coelhos, se desenvolveu de forma nodular, com camada espessa de tecido fribroso, uma característica que é diferente dos demais animais que adquirem a doença naturalmente, onde há presença de lesões ulceradas e exsudativas.

Todos os animais estudados apresentaram diminuição no escore corporal e por volta dos quarenta dias, já apresentavam hiporexia, sinal clínico padrão presente em quase todas as doenças que acometem os animais. As fezes e urinas se mantiveram normais durante todo o tratamento. Não foram observados sinais clínicos compatíveis com dor.

As análises macroscópicas indicaram presença de lesão nodular, com crescimento progressivo e na maioria das vezes pendulares. Em pele, alguns animais não apresentaram alterações, mantendo sua integridade e em outros fora observada alopecia e presença de crostas sobre a lesão, com regiões hiperemicas, mas em nenhum deles notou-se ulceração ou prurido, rotineiramente presentes em outros animais com a doença. Aos cortes das lesões observou-se padrão de necrose do tipo caseosa, recoberta por uma espessa cápsula fibrosa. Não foram observadas alterações nos órgãos internos, mesmo nos animais que apresentaram baixa condição no escore corporal.

Os achados histopatológicos foram compatíveis com as visualizações macroscópicas e não diferiram entre todos os grupos estudados. Ao microscópio, as lesões tinham um centro necrótico, com infiltrado predominantemente eosinofílico, denominado de granuloma composto por eosinófilos. Circundado esta porção, grandes filamentos de colágeno e fibrina, compondo uma parede espessa e fibrosa. Ainda, foram observadas células gigantes, comumente presentes neste tipo de lesão e pequena quantidade de hifas do patógeno, conforme já descrito por SANTURIO & FERREIRO, 2008.

Detalhes de cada bloco experimental estão descritos abaixo.

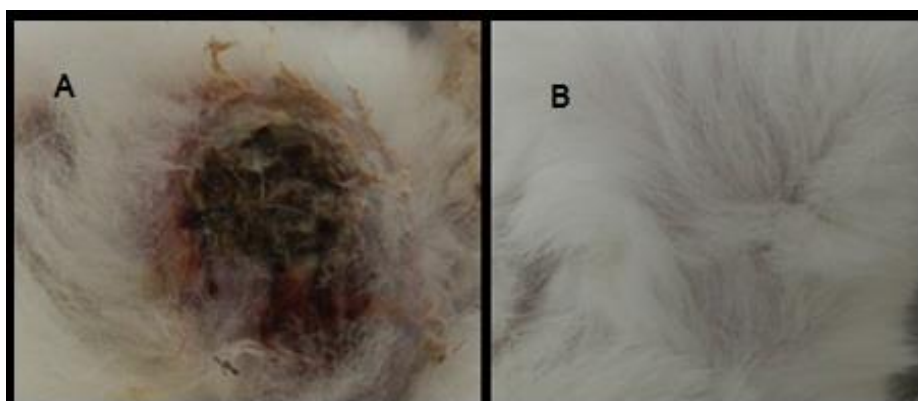
#### 4.1) Bloco 1

A **Tabela 1** mostra os diâmetros das lesões após duas e oito semanas de tratamento.

**Tabela 1:** Tamanho dos diâmetros das lesões, tomados em dois pontos, dos coelhos inoculados com *Pythium insidiosum*, no grupo controle e nos dois grupos tratados com o tanino intralesional.

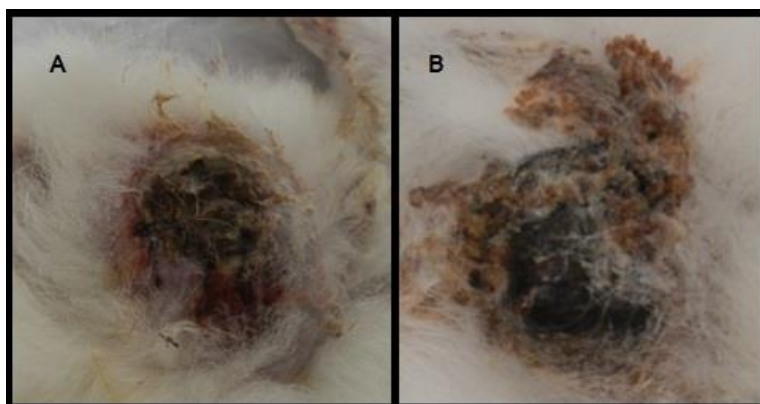
tratamento	tamanho da lesão (mm)	
	início do tratamento	fim do tratamento
<i>Tanino 15mg/mL (coelho 1)</i>	20x27	84x91
<i>Tanino 15mg/mL (coelho 2)</i>	29x21	90x92
<i>Tanino 15mg/mL (coelho 3)</i>	17x19	89x91
<i>Tanino 30mg/mL (coelho 1)</i>	34x32	96x92
<i>Tanino 30mg/mL (coelho 2)</i>	19x20	83x89
<i>Tanino 30mg/mL (coelho 3)</i>	22x26	90x91
<i>Controle (coelho 1)</i>	34x24	96x90
<i>Controle (coelho 2)</i>	14x14	89x91
<i>Controle (coelho 3)</i>	14x18	82x86

As lesões se desenvolveram com o decorrer das semanas e foram observados, independente do grupo estudado, animais com lesões nodulares em pele íntegra e animais com lesões nodulares e presença de discreta alopecia, com formações crostosas e ausência de ulceração (**Figura 6**).



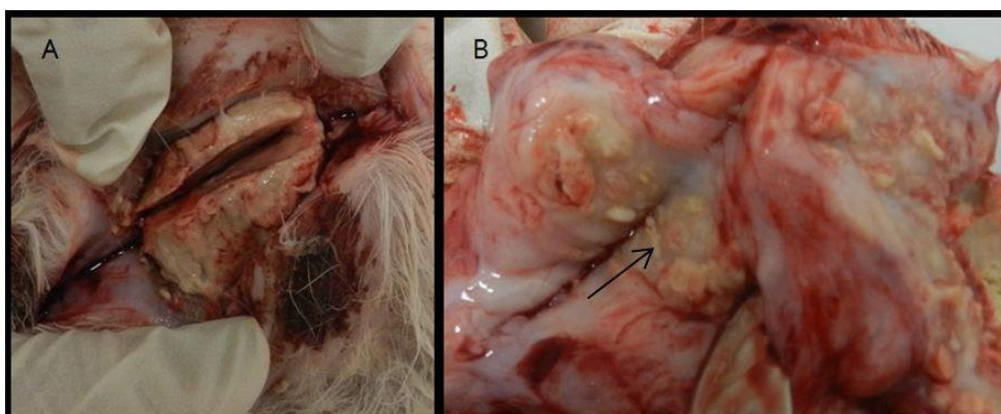
**Figura 6:** Lesões em 2 coelhos do grupo controle. (A) presença de região nodular, com rarefação pilosa e áreas de alopecia, com discreta presença de crostas, porém ausência de ulceração; (B) presença de região nodular com ausência total de alteração em pele.

A macroscopia das lesões indicou não haver diferença entre os grupos avaliados, nem mesmo entre as concentrações testadas, como ilustrado na **Figura 7**.



**Figura 7:** Lesão com 60 dias em um coelho pertencente ao (A) grupo controle e (B) grupo tratado com tanino em concentração de 30 mg/mL. As características macroscópicas se assemelham, sendo observadas lesões crostosas sem ulceração em pele, em ambas animais.

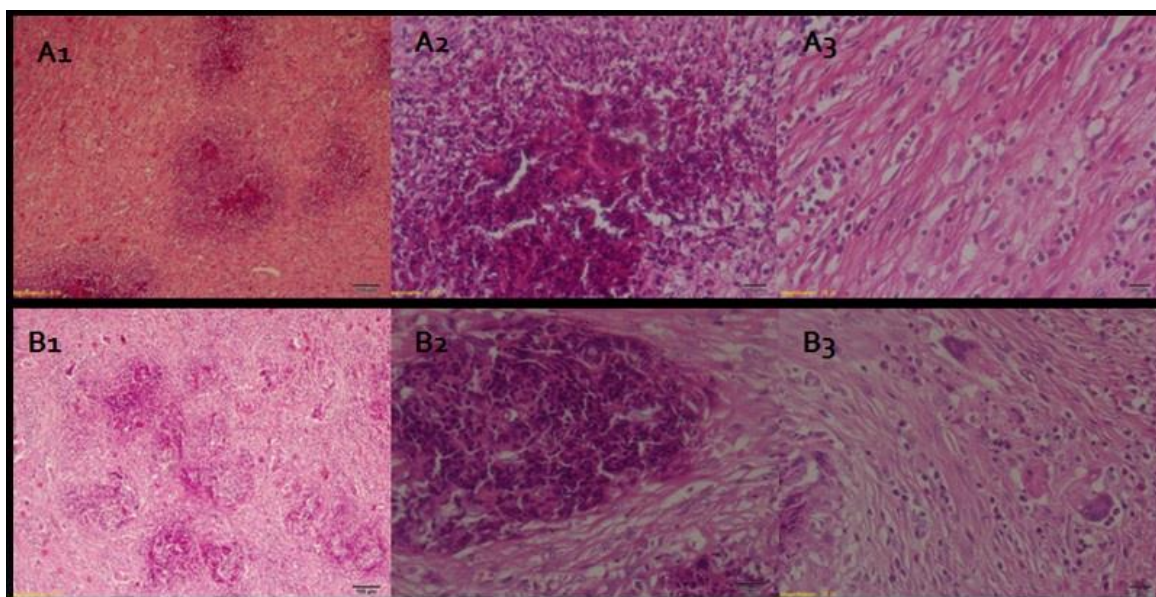
Ao fim dos sessenta dias, os animais foram submetidos à eutanásia, para a coleta de tecido para análise histopatológica e aos cortes observaram-se áreas de necrose caseosa no interior da lesão, o que não diferiu nos três grupos (**Figura 8**).



**Figura 8:** Lesão em um coelho tratado com 30 mg/mL de tanino, no momento da necropsia. (A) nódulo é firme e com parede espessada, (B) notar a presença de necrose caseosa (seta) no centro da lesão.

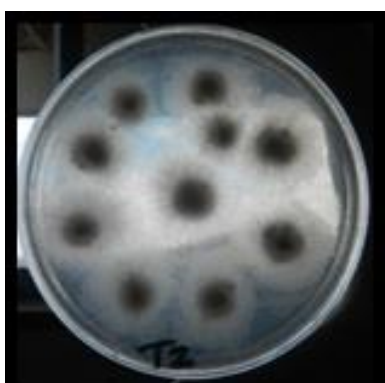


A **Figura 9** ilustra os cortes histológicos em um animal do grupo controle e de um coelho submetido ao tratamento com ácido tânico na concentração de 30 mg/mL.



**Figura 9:** Análises histopatológicas de um dos coelhos pertencentes ao grupo (A) controle; (B) tratado com tanino intralesional em concentração de 30 mg/mL. (1) visão geral de ambos os tratamentos, (2) presença de hifas e células de defesa, com grande quantidade de neutrófilos e eosinófilos, (3) intensa formação de tecido fibroso e células gigantes. Notar que não houve diferença entre os grupos testados. (Hematoxilina-Eosina, A1 e B1 - 20X, A2, B2, A3 e B3 - 40X)

Foram também separados fragmentos para isolamento do agente a partir das lesões. Estes foram lavados em solução de cloranfenicol e água destilada estéril, sendo posteriormente cortados em pequenos fragmentos e inseridos em placas contendo ágar SAB 4% e mantidos em estufa a 37°C. Após 24 horas de incubação, observou-se crescimento do patógeno. A **Figura 10** ilustra o crescimento das hifas de *P. insidiosum*, isolados dos fragmentos de lesões oriundas dos coelhos.



**Figura 10:** Fragmentos de tecido, obtidos através da necropsia de um dos coelhos, cultivados em Agar Sabouraud 4%. Notar a presença das hifas do *P. insidiosum*, após 24 horas de incubação a 37°C.

Em todos os blocos subsequentes, foram realizadas medições quinzenais, coleta de exames laboratoriais, necropsia e biopsias para análise histopatológica e isolamento do agente.

#### **4.2) Bloco 2**

A Anfotericina B é um antibiótico poliênico, com atividade antifúngica de amplo espectro e potencial fungicida, cujo mecanismo de ação envolve sua ligação ao ergosterol, presente na membrana dos fungos (DeLUCIA et al., 2007).

Seu uso terapêutico limita-se a administração intravenosa, uma vez que é pouco absorvida por via oral. Quando administrada por via oral, 3 g de anfotericina B produzem concentrações plasmáticas de 0,5 µg/mL, enquanto a dose intravenosa de 3 mg, concentrações plasmáticas de 25 µg/mL (DeLUCIA et al., 2007). Uma vez na circulação, liga-se a proteínas e distribui-se amplamente pelo organismo, principalmente pulmões, fígado e baço. Pode se manter presente por até 15 dias, sendo 40% excretada via renal, em cerca de 1 semana.

Para sua administração, deve ser diluída em solução glicosada, em concentração de 0,1 mg/mL. Não deve ser adicionada junto à solução salina, pois acarreta precipitação do sal (PRADO et al., 2007).

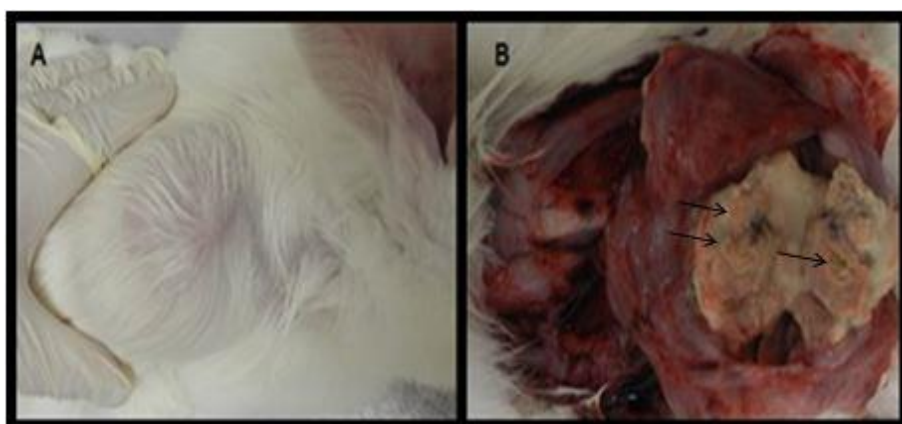
É amplamente utilizada no combate de infecções micóticas, com tempo de tratamento variando entre 6 a 10 semanas. Seu principal efeito adverso é a nefrotoxicidade (PRADO et al., 2007).

No presente trabalho, todas estas informações foram levadas em consideração. Os animais pertencentes a este grupo receberam o tratamento com anfotericina B em dose segura de 1,0 mg/kg, conforme PRADO et al. (2007).

Os 3 animais foram anestesiados com Zoletil® (Virbac, 0,2 mL/Kg) e, após acesso venoso, fora administrada 0,8 mL de Anfotericina B em 40 mL de solução glicosada, num período de aproximadamente 1 hora. O protocolo utilizado foi repetido semanalmente, durante 8 semanas. Optou-se pela administração a cada 7 dias para evitar o estresse nos animais, uma vez que para a administração do fármaco era necessário a realização de anestesia. A **Figura 11** mostra as etapas para a administração da droga em um coelho previamente anestesiado, enquanto a **Figura 12** o momento da necropsia.



**Figura 11:** Realização de tricotomia local, com acesso intravenoso utilizando-se cateter 24G e perfusão da medicação em meio glicosado com equipo microgotas.

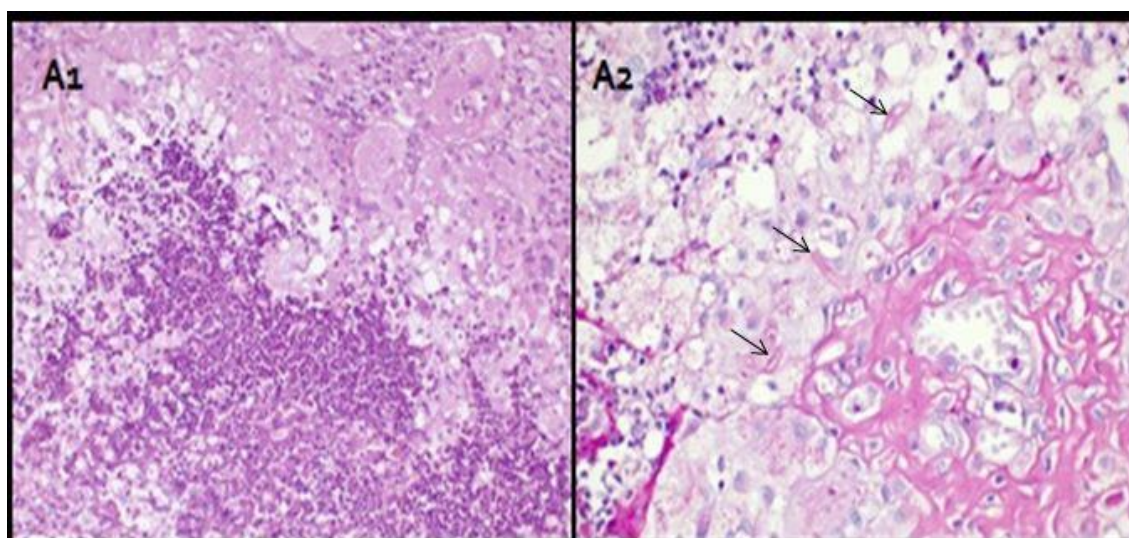


**Figura 12:** Lesão em um coelho tratado com administração semanal de anfotericina B, no momento da necropsia. (A) Presença de nódulo firme, flutuante e ausência de alterações em pele (B) após realizar o corte no nódulo, presença de foco de necrose caseosa (setas), semelhantes a todos os animais tratados com anfotericina B e também dos do grupo controle.

A **Tabela 2** mostra o resultado da evolução da lesão, quando comparado ao grupo controle e a **Figura 13** refere-se às lâminas obtidas junto à histopatologia.

**Tabela 2:** Tamanho dos diâmetros das lesões, tomados em dois pontos, dos coelhos inoculados com *Pythium insidiosum*, no grupo controle e no tratado com anfotericina B.

tratamento	tamanho da lesão (mm)	
	início do tratamento	fim do tratamento
<i>Anfotericina B (coelho 1)</i>	19x28	87x97
<i>Anfotericina B (coelho 2)</i>	24x23	89x94
<i>Anfotericina B (coelho 3)</i>	19x22	87x90
<i>Controle (coelho 1)</i>	34x24	96x90
<i>Controle (coelho 2)</i>	14x14	89x91
<i>Controle (coelho 3)</i>	14x18	82x86



**Figura 13:** Análise histopatológica da lesão de um coelho tratado com Anfotericina B (**A1**) Coloração HE, (**A2**) coloração de PAS. Notar a presença de grande quantidade de células de defesa (**A1**), e hifas do patógeno (setas).

Novamente, não houve diferenças entre os coelhos tratados e o grupo controle.

### 4.3) Bloco 3

As espécies pertencentes ao gênero *Stryphnodendron* spp., nativas do cerrado brasileiro, são popularmente utilizadas para combater reações inflamatórias, atividade antibacteriana e antifúngica (MAZA et al., 2003, SILVA et al., 2009).

Diversas pesquisas científicas apontaram o extrato de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) como um dos principais produtos naturais de efetiva ação contra diversos agentes microbianos (MELLO et al., 1996). Autores indicam que o principal responsável pelo efeito farmacológico é o ácido tânico ou tanino, que se apresenta em maior concentração na casca do “barbatimão” (MELLO et al., 1996; SANTOS et al., 2002).

O extrato do “barbatimão” foi testado em isolados de *Trichophyton rubrum* (fungo dermatófito causador de dermatofitoses, principalmente em humanos), mostrando atividade promissora em inibir o crescimento *in vitro* do mesmo, sendo superior aos efeitos do itraconazol, droga antifúngica comumente utilizada para tratamento das dermatofitoses (SILVA et al., 2009). Alguns estudos demonstraram também sua atividade contra protozoários, dentre eles *Herpetomonas samuelpessoai* (HOLETZ et al., 2005), cercarias e miracídios de *Schistosoma mansoni* (VINAUD et al., 2005) e também para micro-organismos de interesse odontológico (PEREIRA et al., 2010).

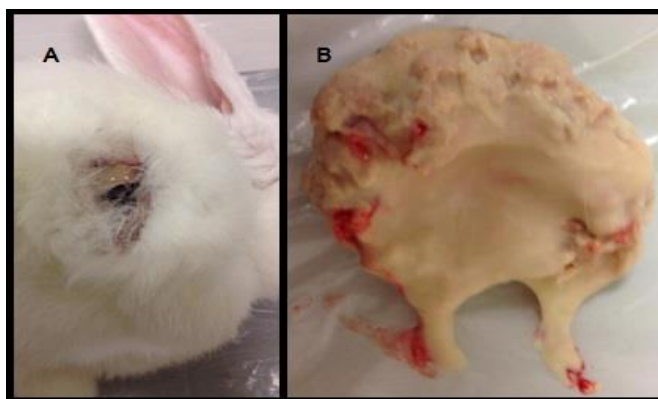
Seu principal composto, tanino, apresenta atividade adstringente, propiciando impermeabilização nas camadas mais expostas da pele, quando administrado externamente, e mucosas, quando internamente. Tem solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MONTEIRO,

2005). Tem sido relatado que ele promove a precipitação de proteínas e/ou polissacarídeos, formando complexos tanino-proteína e/ou tanino-polissacarídeos, o que justifica sua ação antimicrobiana (MELO & SANTOS, 2001). Provavelmente estas ligações ocorreriam através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos do tanino e determinados sítios das proteínas, emprestando estabilidade a estas substâncias (MONTEIRO, 2005).

Por conta de tal complexo, podem também apresentar efeitos tóxicos. CHUNG e colaboradores (1998) relataram que nozes contendo cerca de 25% de tanino podem ser responsáveis pela alta incidência de câncer de esôfago em humanos em uma determinada localidade dos EUA.

*P. insidiosum* possui em sua parede a hidroxiprolina, uma proteína constituída de derivados da prolina, bem como  $\beta$ -glucanas e celulose. Acreditamos que a ação inicial do tanino sobre tal patógeno poderia ter relação com esses componentes.

Em um dos coelhos tratados com o extrato do barbatimão por via oral após vinte dias de tratamento, observou-se que parte da lesão se desprendeu do tecido. Tal animal foi submetido a procedimento de sedação, e a porção lesionada foi retirada da lesão, como ilustra a **Figura 14**.



**Figura 14:** Coelho em que houve desprendimento de porção da lesão (A) presença de lesão profunda, com grande quantidade de pus nas bordas; (B) fragmento retirado, com presença de material caseoso.

Este animal passou a receber também um tratamento associativo tópico, com pomada contendo tanino (10%) e DMSO (1%).

As medições dos diâmetros estão descritas na **Tabela 3**.

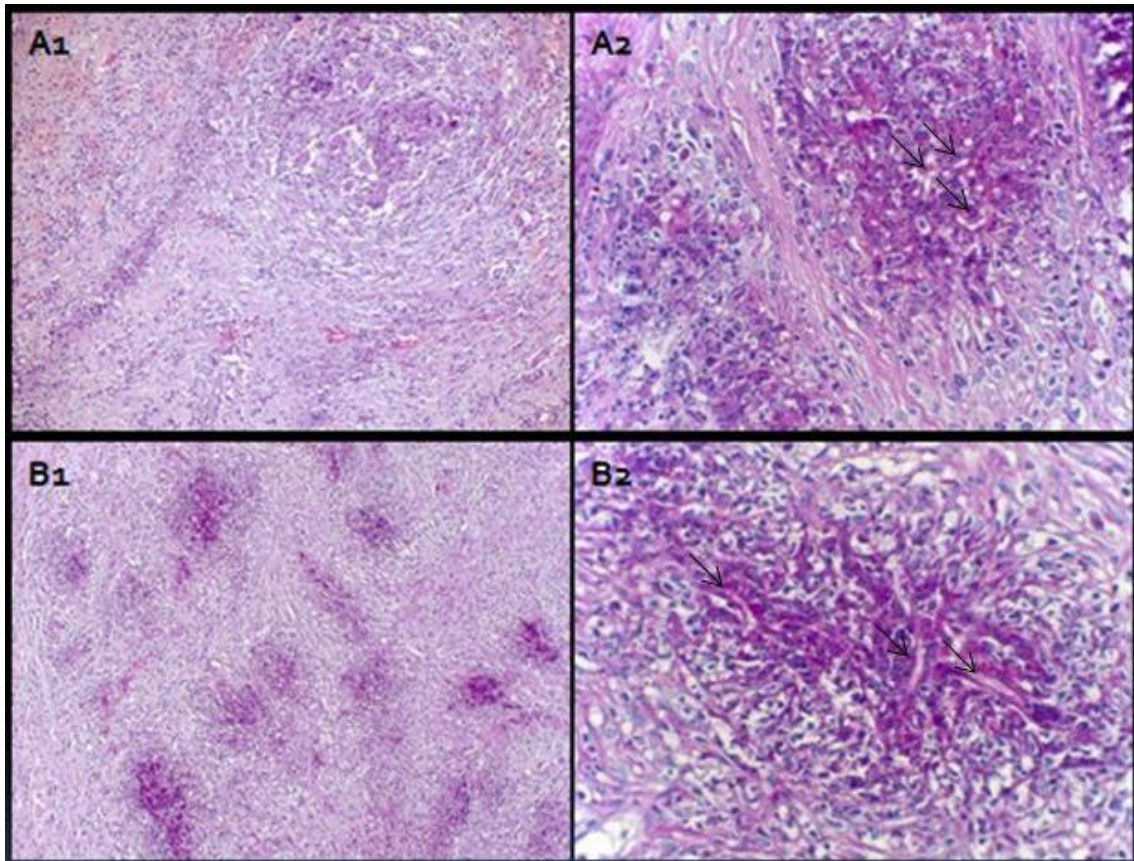
**Tabela 3:** Tamanho dos diâmetros das lesões, tomados em dois pontos, dos coelhos inoculados com *Pythium insidiosum*, no grupo controle e nos grupos tratados com o extrato de barbatimão e ácido tânico purificado, administrados por via oral.

tratamento	tamanho da lesão (mm)	
	início do tratamento	fim do tratamento
<i>Barbatimão (coelho 1)</i>	17x18	88x83
<i>Barbatimão (coelho 2)</i>	14x20	81x90
<i>Barbatimão (coelho 3)</i>	17x21	86x92
<i>Tanino (coelho 1)</i>	17x20	89x91
<i>Tanino (coelho 2)</i>	15x14	84x87
<i>Tanino (coelho 3)</i>	19x18	88x89
<i>Controle (coelho 1)</i>	34x24	96x90
<i>Controle (coelho 2)</i>	14x14	89x91
<i>Controle (coelho 3)</i>	14x18	82x86

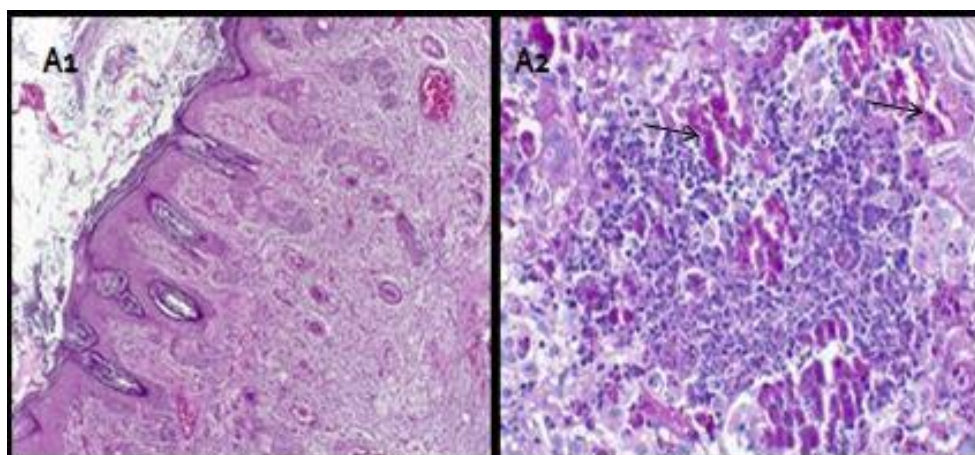
As **Figuras 15** e **16** fazem referência ao momento da necropsia e análise histopatológica, respectivamente. Ressaltamos que do animal submetido ao tratamento tópico, fora enviada também fragmentos das bordas da lesão, para averiguar a presença de tecido íntegro (**Figura 17**).



**Figura 15:** Lesão de um coelho tratado com o tanino por via oral (A) presença de lesão crostosa e áreas de rarefação pilosa; (B) mesma lesão após limpeza das crostas e início de incisão; (C) grande quantidade de sangue após retirada de fragmento para análise histopatológica.



**Figura 16:** Análise histopatológica de lesão obtida de um animal tratado com (A) extrato da casca de barbatimão; (B) ácido tânico. (1) coloração de HE, aumento de 10x; (2) coloração de PAS, aumento de 40x. Os cortes evidenciam congestão moderada, áreas focais de necrose, tecido fibroso bem collagenizado e presença de granulação jovem, com infiltrado difuso e presença de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células gigantes. As setas apontam para a presença das hifas do patógeno.

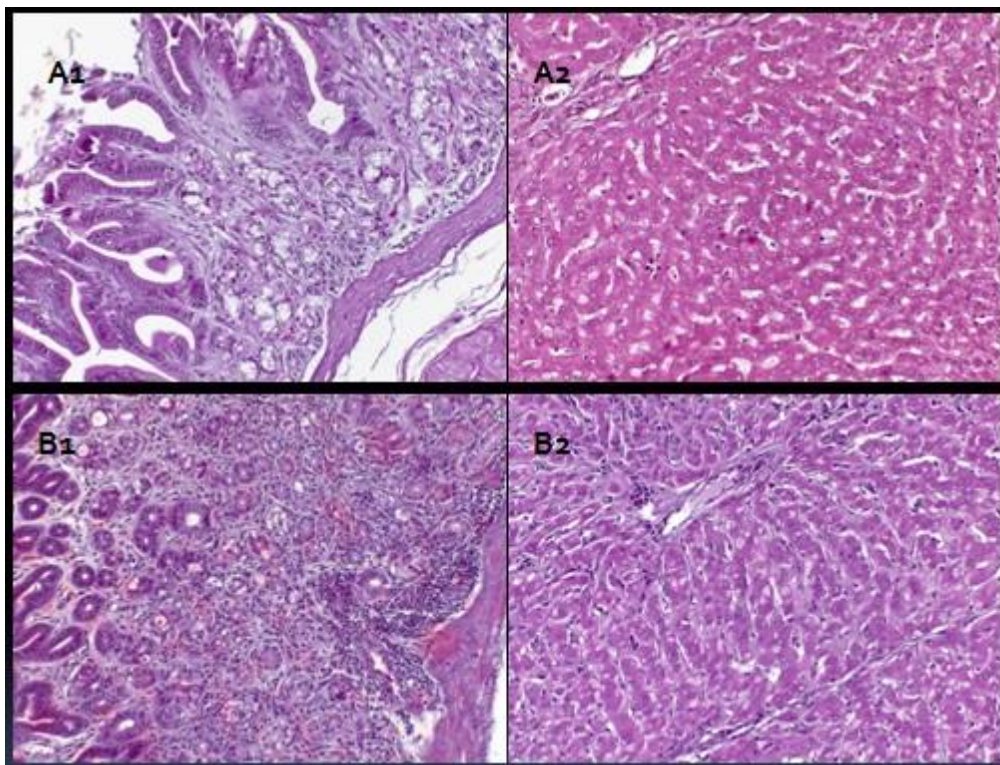


**Figura 17:** Cortes histológicos da borda da lesão do coelho em que fora realizado tratamento tópico. (A1) coloração de HE, aumento de 10x; (A2) coloração de PAS, aumento de 40x. Epiderme apresentando hiperqueratose, congestão moderada em derme superficial e infiltrado mononuclear. Áreas focais de necrose e hifas (setas) coradas, pela coloração de PAS.



Novamente, todas as avaliações, incluindo as obtidas pelo tratamento tópico, indicaram que a doença permanecera estável, sem sinais de regressão ou cura nos grupos tratados.

Visando avaliar a toxicidade da administração de tais componentes nos coelhos, foram enviados fragmentos gástricos e hepáticos e suas análises indicaram órgãos sem alterações compatíveis com toxicidade, como mostra a **Figura 18**.



**Figura 18:** Histopatologia de fragmentos gástricos e hepáticos de coelho tratado, por via oral, com (A) extrato da casca de barbatimão; (B) ácido tânico. (1) tecido gástrico; (2) tecido hepático. Coloração de HE, em aumento de 20x. Ausência de alterações significativas, de efeito tóxico, para ambos os compostos administrados.

#### 4.4) Bloco 4

A última etapa do trabalho envolveu a associação do tanino (na dose de 100 mg/kg) junto ao DMSO (0,5 mL), por via intralesional, a cada 48h, e a administração semanal, por via intramuscular, do acetato de metilprednisolona, em dose de 1 mg/kg.

O DMSO é um composto químico orgânico com elevada capacidade higroscópica, capaz de formar pontes de hidrogênio mais fortes do que o presente em moléculas de água. Uma reação exotérmica é observada quando reage com a água do ar e dos tecidos (BRAYTON, 1996).

É indicado como analgésico e anti-inflamatório e apresenta propriedades antibacteriana e antifúngica (RAND-LUBY et al., 1996). Como é capaz de transpor a pele íntegra, difundindo-se em tecidos e fluídos orgânicos, é frequentemente usado no tratamento de lesões localizadas em tecidos densos ou de difícil acesso. Ainda, por apresentar tal capacidade, é comum seu uso em associação com outras substâncias, possibilitando a penetração das mesmas em tecidos em que há dificuldade para a perfusão medicamentosa. Dosagens seguras sugerem a diluição do DMSO em solução fisiológica, sendo empregado em concentração de 10% (RAND-LUBY et al., 1996).

Em doses anti-inflamatórias, os corticosteróides podem reduzir o infiltrado celular e a inflamação, contribuindo para o controle dos sintomas. Quando de processo severos, geralmente necessita-se de doses imunossupressoras para a obtenção dos resultados desejados. O acetato de metilprednisolona pode ser administrado por via subcutânea ou intramuscular e o protocolo terapêutico apresenta variações, podendo ser empregado com intervalos entre 7 a 30 dias. Seu uso é indicado principalmente para animais estressados e medrosos, pois não necessita administração diária, porém apresenta pouco resultado em inflamações graves (ANDRADE, 2008).

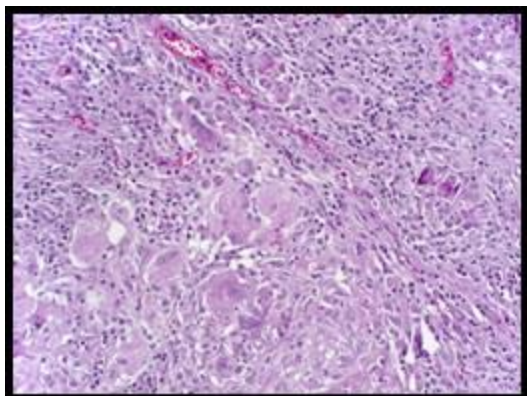
A **Tabela 4** mostra o tamanho das lesões, medidas com o paquímetro, quando comparadas ao do grupo controle.

**Tabela 4:** Tamanho dos diâmetros das lesões, tomados em dois pontos, dos coelhos inoculados com *Pythium insidiosum*, no grupo controle e nos grupos tratados com a metilprednisolona (via intramuscular a cada 7 dias) e DMSO e tanino (via intralesional a cada 48 h).

tratamento	tamanho da lesão (mm)	
	início do tratamento	fim do tratamento
<i>Associação medicamentosa (Coelho 1)</i>	15x23	86x90
<i>Associação medicamentosa (Coelho 2)</i>	21x22	84x87
<i>Associação medicamentosa (Coelho 3)</i>	17x20	85x91
<i>Controle (Coelho 1)</i>	34x24	96x90
<i>Controle (Coelho 2)</i>	14x14	89x91
<i>Controle (Coelho 3)</i>	14x18	82x86

Os aspectos macroscópicos das lesões neste grupo de tratamento não mostraram diferenças em relação ao controle. As análises histopatológicas também mostram que não há diferenças no padrão de resposta inflamatória, como pode ser observado na

**Figura 19.**



**Figura 19:** Histologia de lesão com tratamento associativo, em coloração de HE, aumento de 20x. Notar grande quantidade de células inflamatórias, padrão semelhante às lâminas anteriores, sem alterações significativas.

Em relação às análises de hemograma e perfis bioquímicos séricos dos coelhos do grupo controle e tratados, não foram observadas alterações significativas entre os grupos estudados. No perfil hematológico, foram constatadas alterações no leucograma, quando da primeira e da última coletada, estando presente, na maioria dos animais, leucocitose com neutrofilia. Conforme MILLER & CAMPBELL (1983) são alterações

presentes em todas as espécies animais e fazem parte das características sistêmicas da doença.

No perfil bioquímico sérico, não houve alteração entre os valores no primeiro e último dia de tratamento, sendo os mesmos mantidos dentro dos valores de referência para a espécie.

Estudos iniciais em coelhos como modelo experimental da pitiose datam do final da década de 60 e envolveram a inoculação das hifas do patógeno e esses estudos não resultaram em lesões nos coelhos, pois essa não é a forma infectante do patógeno (ALMEMIYA, 1969, 1982). MILLER & CAMPBELL (1983) foram um dos pioneiros em realizar estudos experimentais bem sucedidos da pitiose em coelhos. Na ocasião, foram testadas as vias subcutânea, intraperitoneal e intravenosa. Nos animais inoculados pela via subcutânea observou-se a formação de lesões nodulares, as quais aumentavam de tamanho conforme o tempo evoluía. A partir do 20º dia de inoculação eram observadas lesões esféricas e preenchidas por pus de coloração amarelo-esverdeada e os abscessos eram encapsulados por tecido conectivo fibroso. As lesões observadas na presente pesquisa mostraram comportamento semelhante aos observados por MILLER & CAMPBELL (1983).

As análises macroscópicas dos coelhos diferem dos equinos e cães com lesão subcutânea por serem observadas presença de intensa necrose caseosa revestida por uma espessa cápsula, ao invés de comprometimento cutâneo com ulceração exsudativa.

Com relação aos achados histopatológicos obtidos nos coelhos, estes foram semelhantes aos observados por SALLIS et al. (2003) em quatorze cavalos com pitiose cutânea, provenientes do município de Uruguaiana/RS, onde fora possível detectar áreas irregulares e eosinofílicas de necrose associadas a imagens negativas tubuliformes de

hifas do patógeno, com presença de infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e grande quantidade de tecido fibrovascular.

A manifestação da doença nos coelhos, com formação de necrose caseosa nas lesões e ausência de ulceração, por apresentar uma capsula fibrosa de proteção, dificultou a administração da droga e perfusão da mesma sobre o tecido comprometido e pode ter contribuído de forma a inviabilizar os tratamentos.

Desta forma, os resultados obtidos indicaram que o coelho, apesar de ser o único modelo experimental *in vivo*, não mimetiza a doença na forma como presente nos demais animais e por isso, não há como afirmar que todos os protocolos terapêuticos desenvolvidos neste trabalho foram ineficazes, uma vez que é possível questionar a difusão de qualquer medicamento frente a uma capsula fibrosa tão extensa que atua de forma a proteger o patógeno.

Logo, antes da busca por novos tratamentos para a pitiose, deve-se descobrir um modelo experimental cuja evolução da doença seja semelhante à observada em equinos e demais animais, pois só assim poderá ser garantido resultados, promissores ou ineficazes, no uso de diferentes protocolos terapêuticos. E ainda, independente do composto utilizado e da comprovação de sua eficácia, talvez sejam necessários procedimentos cirúrgicos prévios, a fim de se retirar a maior quantidade possível de tecido fibroso presente na lesão.

## **5) Conclusão**

Diante dos resultados obtidos conclui-se que, no modelo animal utilizado, nenhum dos protocolos de tratamento resultaram na diminuição do tamanho das lesões ou na cura das mesmas.

## 6) Referências Bibliográficas

- ALEXOPOULOS, C. J., MINS, C. W., BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996; Chap. 3, p.61-85.
- AMEMIYA, J. Isolation of a fungus of the Mortierellaceae from an equine granular dermatitis. III. **Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima**, 19(3), 50, 1969.
- AMEMIYA, J. Granular dermatitis in the horse, caused by *Pythium gracile*. **Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima**, 32, 141-147, 1982.
- ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3ªed. São Paulo: Roca, 2008. 912p.
- ANDERSEN, M. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, 2004. 167p.
- ARGENTA JS, ALVES SH, SILVEIRA F, MABONI G, PEREIRA DI, SPANAMBERG A, SANTURIO JM, FERREIRO L. *In vitro* paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of caspofungin. **Vet. Microbiol.**, v. 145(3-4), p. 321-3, 2010.
- ARGENTA JS, ALVES SH, SILVEIRA F, MABONI G, ZANETTE RA, CAVALHEIRO AS, PEREIRA PL, PEREIRA DI, SALLIS ES, PÖTTER L, SANTURIO JM, FERREIRO L. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol.**, v. 157(1-2), p 137-42, 2012.
- ARGENTA JS, SANTURIO JM, ALVES SH, PEREIRA DIB, CAVALHEIRO AS, SPANAMBERG A, FERREIRO L. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52(2), p. 767-9, 2008.
- AZEVEDO MI, BOTTON SA, PEREIRA DIB, ROBE LJ, JESUS FPK, MAHL CD, COSTA MM, ALVES SH, SANTURIO JM. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Vet. Microbiol.**, v. 159, p. 141- 148, 2012.
- BETONI, J.E.C. *et al.* Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101(4), p. 387-390.
- BISSONNETTE KW, SHARP NJ, DYKSTRA MH, ROBERTSON IR, DAVIS B, PADHYE AA, KAUFMAN L. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 39-44, 1991.

- BOSCO SMG, BAGAGLI E, ARAUJO Jr JP, CANDEIAS JM, MARQUES ME, FRANCO MF, MENDOZA L, CAMARGO RP, MARQUES SA. Human pythiosis, Brazil. **Emerg. Infect Dis.**, v.11(5), p.715-7, 2005.
- BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Vet.** v.76-90, 1986.
- BUERGELT C, POWE J, WHITE T. Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **J. Zoo Wild. Med.**, v. 37(2), p.186–189, 2006.
- CALVANO TP, BLATZ PJ, VENTO TJ, WICKES BL, SUTTON DA, THOMPSON EH, WHITE CE, RENZ EM, HOSPENTHAL DR. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49(10), p. 3710-3, 2011.
- CAVALHEIRO AS, MABONI G, DE AZEVEDO MI, ARGENTA JS, PEREIRA DI, SPADER TB, ALVES SH, SANTURIOJM. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53(5), p. 2136-8, 2009b.
- CAVALHEIRO AS, ZANETTE RA, SPADER TB, LOVATO L, AZEVEDO MI, BOTTON S, ALVES SH, SANTURIO JM. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Vet Microbiol.**, v. 137(3-4), p. 408-11, 2009a
- CHUNG, K.; WONG, T.Y.; WEI,C. et al.**Crit. Ver.Foodo Sci. Nutrition.**, 38, 421, 1998.
- DeCOCK AWAM, MENDOZA L, PADHYE AA, AJELLO L, KAUFMAN L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**,v. 25, p.344-9, 1987.
- DeLUCIA, R. et al. **Farmacologia integrada**. 3ªed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. 720p.
- DYKSTRA MJ, SHARP NJH, OLIVRY T. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Med. Mycol.** 37: 427-433, 1999.
- GAASTRA W, LIPMAN LJA, De COCK AWAM, EXEL ET, PEGGE RBG, SCHEURWATER RV, MENDOZA L. *Pythium insidiosum*: an over-view. **Vet. Microbiol.**, v.146, p. 1–16, 2010.
- GROOTERS AM. Pythiosis, lagenidiosis and zygomycosis in small animals. **Vet. Clin. Small Anim. Pract.**, v. 33, p. 695-720, 2003.
- GROOTERS AM, GEE MK. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **J. Vet. Intern. Med.** V. 16(2), p. 147-52, 2002.



- HOLETZ, F.B. et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 100(4): 397-401, July 2005.
- KASUGA T, TAYLOR JW, WHITE TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37(3), p. 653-63, 1999.
- KAMMARNJESADAKUL P, PALAGA T, SRITUNYALUCKSANA K, MENDOZA L, KRAJAEJUN T, VANITTANAKOM N, TONGCHUSAK S, DENDUANGBORIPANT J, CHINDAMPORN A. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and Internal Transcribed Spacer Regions (ITS). **Med. Mycol.**, v. 49(3), p. 289-95, 2011.
- KAUFFMAN L. *Penicilliosis marneffei* and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**, v.143, p.3-7, 1998.
- KOUFOPANOU V, BURT A, SZARO T, TAYLOR JW. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). **Mol. Biol. Evol.**, v. 18(7), p. 1246-58, 2001.
- KRAJAEJUN T, LOWHNOO T, YINGYONG W, et al. *In vitro* antimicrobial activity of volatile organic compounds from *Muscodor crispans* against the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 43(6), p. 1474-1483, 2012.
- LARSON CE, MENG MC, NAHAS CR, MICHALANY NS, NEWTON J, ROSA PS, BONAVIDO D, GAMBALE W, SOARES ES. Pitiose canina - Aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. **Anais...Gramado: XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. P.155, 1997.
- LOOMIS, T.A; HAYES, A.W. **Loomis's essentials of toxicology**. 4<sup>a</sup> ed. London: Academic press limited, 1996. 282p.
- LÓPEZ-ROMERO E, REYES-MONTES MDEL R, PÉREZ-TORRES A, RUIZ-BACA E, VILLAGÓMEZ-CASTRO JC, MORA-MONTES HM, FLORES-CARREÓN A, TORIELLO C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiol.**, v. 6(1), p. 85-102, 2011.
- LORETO ES, ALVES SH, SANTURIO JM, NOGUEIRA CW, ZENI G. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol.**, v. 156(1-2), p. 222-6, 2012.

- LORETO ES, MARIO DA, DENARDI LB, ALVES SH, SANTURIO JM. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55(7), p. 3588-90, 2011.
- MARIMON R, CANO J, GENÉ J, SUTTON DA, KAWASAKI M, GUARRO J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45(10), p. 3198-206, 2007.
- MARQUES SA, BAGAGLI E, BOSCO SMG, CAMARGO RMP, MARQUES ME. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81(5), p. 483-5, 2006.
- MATUTE DR, MCEWEN JG, PUCCIA R, MONTES BA, SAN-BLAS G, BAGAGLI E, RAUSCHER JT, RESTREPO A, MORAIS F, NIÑO-VEGA G, TAYLOR JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23(1), p. 65-73, 2006.
- MELLO, J.P.C.; SANTOS, S.C. **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C.M.O.; Schenckel, E.P., orgs; Ed. UFSC:Porto Alegre, 3ªed, 2001.
- MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry** 41: 807-813, 1996.
- MENDOZA L, HERNANDEZ F, AJELLO L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Clin. Microb.**, v.31, p.2967-73, 1993.
- MENDOZA L, AJELLO L. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Mycol. Med.**, v. 6, p. 151-164, 1996.
- MENDOZA L, KAUFMAN L, MANDY W, GLASS R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 4(6), p. 715-8, 1997.
- MENDOZA L, VILLALOBOS J, CALLEJA CE, SOLIS A. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. **Mycopathologia**, v. 119(2), p. 89-95, 1992.
- MILLER RI. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Aust Vet J.**, v.57, p. 377-82, 1981.
- MILLER; R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**. v. 21, p.331-341, 1983.

- MONTEIRO, J.M. *et al.* **Taninos: uma abordagem da química a ecologia.** Quim. Nova, v.28, n.5, 892-896, 2005.
- PEREIRA DIB, SANTURIO JM, ALVES SH, ARGENTA JS, PÖTTER L, SPANAMBERG A. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60(5), p. 1168-71, 2007.
- PEREIRA DI, SCHILD AL, MOTTA MA, FIGHERA RA, SALLIS ES, MARCOLONGO-PEREIRA C. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. **Vet. Res. Commun.**, v. 34(3), p. 301-6, 2010.
- PESAVENTO PA, BARR B, RIGGS SM, EIGENHEER AL, PAMMA R, WALKER RL. Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Vet. Pathol.**, v. 45, p. 538–541, 2008.
- PRADO, F.C., RAMOS, J., VALLE, J.R. **Atualização terapêutica 2007.** 23ª ed. São Paulo: Artes médicas, 2007. 2300 p.
- PUPAIBOL J., CHINDAMPORN A., PATARAKUL K., SUANKRATAY C., SINDHUPHAK W., KULWICHIT W. Human pythiosis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12(3), p. 517-518, 2006.
- RAKICH PM; GROOTERS AM; TANG K. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 262–269, 2005.
- RAND-LUBY, L., et al. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. **Ann. Surg.** v.224,n.4, p.583-590, 1996.
- REIS Jr. J L, CARVALHO ECQ, NOGUEIRA RHG, LEMOS LS, MENDOZA L. Disseminated pythiosis in three horses. **Vet. Microbiol.**, v. 96, p. 289-95, 2003.
- 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.
- SANTURIO JM, ARGENTA JS, SCHWENDLER SE, CAVALHEIRO AS, PEREIRA DI, ZANETTE RA, ALVES SH, DUTRA V, SILVA MC, ARRUDA LP, NAKAZATO L, COLODEL EM. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Vet. Rec.**, v. 163(9), p. 276-7, 2008.
- SANTURIO JM, ALVES SH, PEREIRA DB, ARGENTA JS. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 1-14, 2006.

- SANTURIO JM, FERREIRO L. **Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica**. 1ª ed., Porto Alegre: UFRGS editora, 2008. 111p.
- SANTURIO JM, MONTEIRO AB, LEAL AT, KOMMERS GD, DE SOUSA RN, CATTO JB. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, p. 123-25, 1998.
- SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; RIBEIRO, J.P. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, p. 292-299, 2002.
- SCHURCKO A, MENDOZA L, De COCK AWAM, KLASSEN GR. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and Americas are explored. **Mycol.**, v. 95, p. 200-208, 2003.
- SILVA, F.M.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v. 52(6), p. 511-517, 2009.
- SRIPHANA U, et al. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia**, v. 91C, p. 39-43, 2013a.
- SRIPHANA U, THONGSRI Y, PRARIYACHATIGUL C, PAKAWATCHAI C, YENJAI C. Clauraila E from the roots of *Clausena harmandiana* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 36(9), p. 1078-83, 2013b.
- TABOSA IM, RIET-CORREA F, NOBRE VTM, AZEVEDO EO, REIS-JUNIOR JL, MEDEIROS RMT. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Vet. Pathol.**, v. 41, p. 412-5, 2004.
- TEIXEIRA MD, THEODORO RC, OLIVEIRA FF, MACHADO GC, HAHN RC, BAGAGLI E, SANBLAS G, FELIPE MS. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med. Mycol.** 2013 Jun 14. [Epub ahead of print]
- TORRES-NETO R, BOSCO SMG, AMORIN RL, BRANDÃO CV, FABRIS VE, ESTANISLAU C, BAGAGLI E. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. **Vet. Dermatol.**, v. 21(2), p. 202-4, 2010.
- TRISCOTT MA, WEEDON D, CABANA E. Human subcutaneous pythiosis. **J. Cutaneous Pathol.**, v. 20, p. 267-71, 1993.
- VIDELA R, VAN AMSTEL S, O'NEILL SH, FRANK LA, NEWMAN SJ, VILELA R, MENDOZA L. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Med. Mycol.**, v. 50(2), p. 219-24, 2011.

VINAUD, M.C. et al. Avaliação da atividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* spp. sobre miracídeos e cercárias de *Schistosoma mansoni*. **Revista de Patologia Tropical**. Vol. 34 (2): 137-143. maio-ago. 2005.

WELLEHAN JF, FARINA LL, KEOUGHAN CG, LAFORTUNE M, GROOTERS AM, MENDOZA L, BROWN M, TERRELL SP, JACOBSON ER, HEARD DJ. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*), **J. Zoo Wild. Med.**, v. 35, p. 564-568, 2004.

ZANETTE RA, BITENCOURT PE, ALVES SH, FIGHERA RA, FLORES MM, WOLKMER P, HECKTHEUER PA, THOMAS LR, PEREIRA PL, LORETO ES, SANTURIO JM. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. **Vet. Microbiol.**, v. 162(2-4), p. 826-30, 2013.

ZANETTE RA, BITENCOURT PER, WEIBLEN C, PILOTTO MB, PIGATTO AS, CEOLIN RB, MORETTO B, ALVES SH, SANTURIO JM. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to garlic extract. **African J. Microbiol. Res.**, v. 5(29), p. 5316-8, 2011.

## 7) Anexos

### ANEXO I

## *Certificado*

Certificamos que o Protocolo nº 370-CEUA, sobre “Avaliação do ácido tânico (tanino) no tratamento da pitiose experimental em coelhos”, sob a responsabilidade de **Sandra de Moraes Gimenes Bosco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, em reunião de **18/11/2011**.

Botucatu, 18 de novembro de 2011.

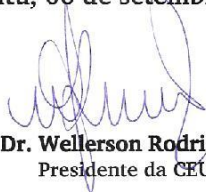


**Prof. Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**  
Presidente - CEUA

## *Certificado*

Certificamos que o Protocolo nº 536-CEUA, sobre “Avaliação da toxicidade do extrato da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e do ácido tânico purificado pela via oral”, sob a responsabilidade de **Sandra de Moraes Gimenes Bosco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 06 de setembro de 2013.



**Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano**  
Presidente da CEUA