

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Avaliação do Efeito Fotodinâmico sobre o Crescimento *in vitro* de *Pythium insidiosum*

Layla Pires

Botucatu, Julho de 2010.

**AValiação DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O
CRESCIMENTO
IN VITRO DE *Pythium insidiosum*
LAYLA PIRES**

2010

Layla Pires

Avaliação do Efeito Fotodinâmico sobre o Crescimento
in vitro de *Pythium insidiosum*

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto de Biociências, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu para obtenção do título
de Bacharel em Física Médica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla
Co-orientadora: Prof. Dr. Sandra de Moraes Gimenes Bosco

BOTUCATU
2010

Dedicatória

Aos meus avós, Alcides e Nair (*in memoriam*), fontes de força, sabedoria e perseverança em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Ramiro e Rosangela, que dedicaram suas vidas a me educar e me proporcionaram toda a base para que eu pudesse chegar aqui.

Ao meu namorado Paulo, que esteve presente ao meu lado durante todo este processo me apoiando e dando suporte para eu seguir em frente.

Agradecimentos

Aos meus pais Ramiro Donizete Pires e Rosangela Aparecida Salvatti Pires presentes diariamente em minha vida, agradeço todo carinho, apoio, incentivo e amor. Sem o esforço de vocês não seria possível concluir mais esta etapa de minha vida. Muito obrigada.

Ao meu namorado, Paulo Augusto de Souza Zingra Vomero, grande incentivador, amigo e companheiro, que completa e dá um sentido ainda maior às minhas conquistas.

A toda minha família que sempre me apoiou, acreditou e torceu por mim.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla por acreditar no meu potencial e me possibilitar a realização deste trabalho. Agradeço à orientação e paciência.

À Prof. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco pela amizade, paciência, apoio e dedicação diária em todas as etapas deste trabalho. Muito obrigada por todos os ensinamentos, sem você não seria possível a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Cristina Kurachi, que mesmo à distância, esteve sempre presente e disponível para solucionar minhas dúvidas e me orientar.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bagagli por possibilitar a realização do meu trabalho em seu laboratório.

À Prof. Dra. Miriam Tsunemi pelo auxílio com toda a parte estatística deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Ariane, Assis, Gabriel, Michelle, Raquel, Talis, Tamara, Tarsila que tiveram paciência ao me ensinar as primeiras regras de microbiologia, muito obrigada pelo apoio e amizade.

À seção de fotografia da Unesp de Botucatu, em especial ao Silvio e ao Silvinho, responsáveis pela maioria das fotografias expostas neste trabalho. Muito obrigada pela atenção e disponibilidade.

A todos os funcionários e docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, muito obrigada pelo apoio.

A todos os funcionários e docentes do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências de Botucatu, muito obrigada pelo apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro. Processo número 2008/03511-8.

Resumo

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que combina o uso de uma substância fotossensibilizadora e luz para causar a morte celular. As drogas utilizadas nesse processo são conhecidas como fotossensibilizadores e possuem pouca ou nenhuma toxicidade às células do hospedeiro. Sob iluminação, estas substâncias produzem espécies reativas de oxigênio capazes de promover danos a biomoléculas da célula-alvo. A iluminação precisa da área alvo aumenta a seletividade da terapia, uma vez que o processo fotodinâmico ocorre somente na área irradiada. A Pitiose, por exemplo, é uma doença causada por um micro-organismo semelhante a fungo denominado *Pythium insidiosum*. Acomete o homem e animais, sendo mais freqüentemente observada na espécie eqüina. No homem, a doença pode se manifestar nas formas oftálmica, cutâneo-subcutânea ou sistêmica. Por não ser um fungo verdadeiro, o agente não responde à maioria das drogas antifúngicas disponíveis, tornando difícil o tratamento da doença. Procedimentos cirúrgicos extensos, como amputação de membros, são indicados; porém as recidivas são freqüentes. A utilização de imunoterápicos em associação ao debridamento cirúrgico tem mostrado algum resultado, entretanto não totalmente eficazes. A pitiose é uma doença emergente, pouco explorada nos aspectos etiológicos e terapêuticos, os quais são limitados e pouco efetivos, dessa forma, se faz necessárias pesquisas para o desenvolvimento de novos tratamentos. Neste sentido, o presente trabalho avaliou o efeito da PDT no crescimento *in vitro* do patógeno utilizando dois fotossensibilizadores, porfirina e clorina, com diferentes concentrações e diferentes dosagens energéticas. Nos ensaios utilizando a porfirina como fotossensibilizador, os melhores resultados foram obtidos para 25mg/mL da droga e 100J/cm². Nos ensaios com a clorina, os resultados foram semelhantes, entretanto foram utilizadas menores

concentrações de fotossensibilizador (0,7, 1,0, e 1,3mg/mL) com 70J/cm². Além desta terapia, foi testada a fim de obter comparação, uma droga convencional no tratamento de fungos, nas concentrações de 25, 50 and 100µg/mL. A inibição do crescimento do patógeno utilizando a Terapia Fotodinâmica foi significativamente maior quando comparada ao tratamento convencional (Anfotericina B), a qual não apresentou nenhum efeito inibitório sobre o crescimento do patógeno. Ainda que preliminares esses resultados são promissores e representam uma inovação no tratamento da pitiose.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; *Pythium insidiosum*; pitiose; porfirina; clorina; anfotericina B.

Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) is a therapeutic method which employs a photosensitizer and light to cause cellular death. The chemical compounds have low or none toxicity for hosts cells. Under the incidence of light, in an appropriated wavelength, these chemical compounds produce reactive oxygen which affects the biomolecules of the target-cells. The specific illumination of the affected area increases the selectivity of the therapy, since the photodynamic process occurs only in the irradiated area. Pythiosis, for instance, is a life-threatening emerging disease caused by a fungus-like organism called *Pythium insidiosum*. The disease occurs in man and other animals, being mostly observed in horses. Human pythiosis may present as ophthalmic, cutaneous-subcutaneous and systemic forms of lesions. Due to the fact that *P. insidiosum* is not a true fungus, it is refractory to most antifungal drugs and the treatment of the disease is difficult. Extensive surgery procedures, such as limb amputation, are the treatment of choice, however relapses may occur frequently. Although not totally effective, the use of immunotherapy associated to surgery have shown some results. Considering that pythiosis is an emerging disease few explored in its etiological and therapeutic aspects, which are limited and few effective, it is of great importance to encourage the development of researches for new strategies of treatment. In this sense, it was evaluated the effect of PDT on *in vitro* growth of the pathogen employing two chemical compounds as photosensitizer, porphyrin and chlorine, at different concentrations in combination with several energetic dosages. Porphyrin showed inhibition of growth at 25mg/mL with 100J/cm² of energetic dosage and chlorine showed similar results employing low concentrations (0,7, 1,0 and 1,3mg/mL) with 70J/cm² of energetic dosage. It was also tested Amphotericin B as a comparative conventional antifungal treatment, at

concentrations of 25, 50 and 100 µg/mL. The inhibition growth of the pathogen with PDT treatments was significantly higher than the one observed with Amphotericin B, which had no effect on *in vitro* growth of the pathogen. Although preliminary, these results are promising and may represent an innovative treatment for pythiosis.

Keywords: photodynamic therapy; *Pythium insidiosum*; pythiosis; porphyrin; chlorine; amphotericin B.

Lista de Ilustrações

- Figura 2-1. Imagem comparativa das colônias de *Pythium insidiosum* B01 que receberam a porfirina na concentração de 25mg/mL com o grupo controle. As imagens indicadas com as letras A representam as colônias nas quais a porfirina foi aplicada e as indicadas com a letra B representam o grupo controle. Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 120 e 240h, respectivamente 31
- Figura 2-2. Imagem comparativa do crescimento do isolado de *Pythium insidiosum* B01 referente ao grupo controle (A) e ao grupo que foi irradiado com 100J/cm²(B) 32
- Figura 2-3. Imagem comparativa dos resultados obtidos do efeito fotodinâmico sobre o crescimento do isolado *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) e do grupo que foi irradiado com 100J/cm² (530nm) e fotossensibilizador na concentração de 25mg/mL. (B) ausência de crescimento e (C) discreto crescimento 33
- Figura 2-4. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das hifas de *Pythium insidiosum* do isolado B01 do grupo controle. (A) visão geral das ramificações das hifas do patógeno (800X); visão detalhada das hifas integras, largas e cilíndricas (B – 2012X; C – 6130X; D – 3000X)..... 34
- Figura 2-5. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das hifas de *Pythium insidiosum* do isolado B01 do grupo efeito luminoso (100J/cm²). (A) visão geral das ramificações das hifas do patógeno (800X); visão detalhada das hifas integras, largas e cilíndricas (B, C e D 6000X) 35
- Figura 2-6. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das hifas de *Pythium insidiosum* do isolado B01 do grupo fotossensibilizador (porfirina – 25mg/mL). (A) visão geral das ramificações das hifas do patógeno (400X); largas e cilíndricas (B – 1600X; C – 1600X; D – 3000X)..... 36
- Figura 2-7. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das hifas de *Pythium insidiosum* do isolado B01 do grupo que recebeu o tratamento fotodinâmico (20mg/mL e 100J/cm²). (A) visão geral da perda de integridade das hifas e deposição de material amorfo (2344X). (B) hifas deformadas, com perda da morfologia cilíndrica e ruptura em alguns pontos (5960X). (C e D) Ênfase na deposição de material amorfo e deformidade das hifas (15412X e 14901X, respectivamente) 37

- Figura 3-1. Representação da utilização do Software ImageJ® para obtenção das medidas de diâmetro das colônias de *Pythium insidiosum*..... 43
- Figura 3-2. Imagem comparativa das colônias de *Pythium insidiosum* B01 que receberam clorina na concentração de 1,3mg/mL com o grupo controle. As imagens indicadas com as letras A representam o grupo controle e as indicadas com a letra B representam o grupo que recebeu clorina. Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente..... 45
- Figura 3-3. Imagem comparativa das colônias de *Pythium insidiosum* B01 que foram irradiadas com o grupo controle. As imagens indicadas com as letras A representam o grupo controle e as indicadas com a letra B representam o grupo que foi irradiado com 70J/cm². Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente 48
- Figura 3-4. Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) com as que receberam tratamento com 30J/cm² e clorina na concentração de 1,3mg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente..... 51
- Figura 3-5. Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) com as que receberam tratamento com 50J/cm² e clorina na concentração de 1,0mg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente..... 52
- Figura 3-6. Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) com as que receberam tratamento com 70J/cm² e clorina na concentração de 1,0mg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente..... 52
- Figura 3-7. Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) com as que receberam Anfotericina B na concentração de 100µg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente..... 62

Lista de Tabelas

Tabela 3-1. Protocolos de Terapia Fotodinâmica, empregando-se várias concentrações de clorina e doses energéticas, utilizados para o isolado de <i>Pythium insidiosum</i> B01.....	42
Tabela 3-2. Análise estatística dos ensaios realizados apenas com a clorina no isolado B01 com colônia-mãe de 48h.....	46
Tabela 3-3. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-2.....	46
Tabela 3-4. Análise estatística dos testes realizados apenas com a clorina no isolado B01 com colônia-mãe de 5 dias.....	47
Tabela 3-5. Análise estatística dos testes realizados apenas com a luz (660nm) no isolado B01 com colônia-mãe de 48h.....	49
Tabela 3-6. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-5.....	49
Tabela 3-7. Análise estatística dos testes realizados apenas com a luz (660nm) no isolado B01 com colônia-mãe de 5 dias.....	50
Tabela 3-8. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 1 (30J/cm ²) e colônia-mãe de 48h	53
Tabela 3-9. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-8.....	54
Tabela 3-10. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 2 (50J/cm ²) e colônia-mãe de 48h	55
Tabela 3-11. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-10.....	55

Tabela 3-12. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 3 (70J/cm ²) e colônia-mãe de 48h	56
Tabela 3-13. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-12	57
Tabela 3-14. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 4 (30J/cm ²) e colônia-mãe de 5 dias	58
Tabela 3-15. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-14	58
Tabela 3-16. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 5 (50J/cm ²) e colônia-mãe de 5 dias	59
Tabela 3-17. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-16	60
Tabela 3-18. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 6 (70J/cm ²) e colônia-mãe de 5 dias	61
Tabela 3-19. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-18	61
Tabela 3-20. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para Anfotericina B e colônia-mãe de 48h	63
Tabela 3-21. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-20	63
Tabela 3-22. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para Anfotericina B e colônia-mãe de 5 dias	64

Tabela 3-23. Taxa de Inibição para as primeiras 24h para cada tratamento realizado utilizando o isolado B01	65
---	----

Tabela 3-24. Taxa de Inibição do tratamento convencional (Anfotericina B), utilizando o isolado B01	66
---	----

Lista de Abreviaturas

°C = graus Celsius

cm² = centímetros quadrados

h = hora

J = Joule

Laser = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LED = Light Emitting Diode

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

mg = miligrama

mL = mililitro

μL = micro litro

PDT = Photodynamic Therapy – (Terapia Fotodinâmica)

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

Sumário

Lista de Ilustrações

Lista de Abreviações

Resumo

Abstract

Capítulo 1 – Noções Gerais de Terapia Fotodinâmica e Pitiose 18

1 - Introdução	18
1.1 - Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica	19
1.2 - Fontes de luz	20
1.3 - Janela Terapêutica	21
1.4 - Características dos fotossensibilizadores	22
1.5 - Histórico da Pitiose	23
1.6 - Tratamentos convencionais da Pitiose	25
2 - Objetivos	27
2.1 - Objetivo Geral	27
2.2 - Objetivos específicos	28

Capítulo 2 - Avaliação do Efeito Fotodinâmico Sobre o Crescimento *in vitro* de *Pythium insidiosum* utilizando a porfirina como agente fotossensibilizador 29

1 - Metodologia	29
1.1 - Isolados e padronização dos fragmentos	29
1.2 - Agente fotossensibilizador	29
1.3 - Fonte luminosa	30
1.4 - Avaliação da ação dos fotossensibilizadores sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	30
1.5 - Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	30
1.6 - Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	31
1.7 - Análise dos resultados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
2 - Resultados	32

2.1 - Avaliação da ação dos fotossensibilizadores sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	32
2.2 – Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	33
2.3 – Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento <i>in vitro</i> de isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	33
2.4 - Análise dos resultados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
3 - Discussão	38
Capítulo 3 - Avaliação do Efeito Fotodinâmico Sobre o Crescimento <i>in vitro</i> de <i>Pythium insidiosum</i> utilizando a clorina como agente fotossensibilizador	40
1 - Metodologia.....	40
1.1 - Isolados e padronização dos fragmentos	40
1.2 - Agente fotossensibilizador.....	40
1.3 - Fonte luminosa.....	41
1.4 - Avaliação da ação dos fotossensibilizadores sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	41
1.5 - Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	41
1.6 - Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	42
1.7 - Avaliação do efeito da Anfotericina B sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	43
1.8 - Análise dos resultados	44
2 - Resultados.....	45
2.1 - Avaliação do efeito da clorina sem exposição à luz sobre o crescimento do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	45
2.2 - Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento dos isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	48
2.3 - Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento dos isolados de <i>Pythium insidiosum</i>	52
2.4 - Avaliação do efeito da Anfotericina B sobre o crescimento <i>in vitro</i> do isolado de <i>Pythium insidiosum</i>	63

2.5 - Taxa de Inibição do crescimento do <i>P. insidiosum</i> para os tratamentos de Terapia Fotodinâmica e Anfotericina B.....	66
3 - Discussão	67
Capítulo 4 – Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.....	69
4.1 - Discussão	69
4.2 - Conclusões finais	72
4.3 – Referências Bibliográficas	73

Capítulo 1 – Noções Gerais de Terapia Fotodinâmica e Pitiose

1 - Introdução

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que combina o uso de uma substância fotossensibilizadora e luz para causar a morte celular. Sob iluminação, estas substâncias produzem espécies reativas de oxigênio capazes de promover danos a biomoléculas da célula-alvo. A aplicação de luz e corantes para inativação de micro-organismos não é uma descoberta recente, porém foi pouco explorada, possivelmente devido à descoberta das drogas antimicrobianas (WAINWRIGHT, 1998; JORI; BROWN, 2004).

Os principais alvos para a terapia em células de mamíferos são lisossomos, mitocôndrias e membranas plasmáticas, enquanto que em células microbianas o dano à membrana externa desempenha um papel importante, pois pode impedir o dano ao DNA. Existe uma infinidade de aplicações da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana ou Inativação Fotodinâmica, especialmente no caso de infecções (JORI et al., 2006). Isto se torna especialmente importante devido ao alarmante crescimento da resistência a antibiótico e a necessidade de métodos alternativos de tratamento local tornam-se necessários (BOEHNCKE et al., 2000). Além disso, em muitas infecções localizadas, antibióticos administrados de forma oral ou sistêmica não são particularmente efetivos, ou porque as bactérias estão infectando um tecido que não é bem perfundido ou porque as bactérias estão presentes no tecido como um biofilme, o que reduz dramaticamente a susceptibilidade ao antibiótico. Para que a terapia possa ser usada no futuro para combater infecções localizadas difíceis de tratar, é necessário que o fotossensibilizador seja capaz de

ser administrado de forma local, tópica ou intracavitária e, depois de um tempo adequado, proceder à irradiação da área infectada com luz em dose e comprimento de onda adequados, com fibra óptica, ponta difusora e outros ou por iluminação direta da área exposta cirurgicamente (CALZAVARA-PINTON et al., 2004; CHOUDARY et al., 2009).

O interesse por tratamentos fungicidas eficientes vem aumentando recentemente, devido ao crescente número de patógenos fúngicos causadores de infecções nosocomiais ou micoses oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Infelizmente, agentes seguros e específicos são escassos e a maioria deles é somente fungistática, ou seja, não provocam a morte, apenas inibem a multiplicação. Além disso, o uso rotineiro de antibioticoterapia leva progressivamente ao aparecimento de linhagens resistentes (JORI; BROWN, 2004). Com isso, tem havido um interesse na retomada de estudos por inativação fotodinâmica em fungos e o alvo tem sido principalmente para fungos patogênicos ou potencialmente patogênicos, destacando-se a *Candida albicans* (BLISS et al., 2004).

1.1 - Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica

A fotodestruição dos tecidos pode ocorrer de duas maneiras diferentes: através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou do oxigênio *singlete* (mecanismo tipo II). No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas (preferencialmente O₂), produzindo radicais ou íons radicais por meio de reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons (ZHU; FINLAY, 2008). A maioria destes radicais reage instantaneamente com o O₂, gerando uma mistura complexa de espécies

reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxila, os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas (RIBEIRO et al, 2007).

No mecanismo tipo II obtém-se oxigênio singlete, altamente reativo, através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio. Como as reações de transferência de energia são mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons, o mecanismo tipo II é geralmente favorecido nas reações de fotoxidação (ZHU et al., 2007). Como o tempo de vida do oxigênio singlete é muito curto ($\sim 2 \mu\text{s}$), esta espécie reativa reage no seu sítio de formação, dessa forma, moléculas do fotossensibilizador não ligadas às células não serão fototóxicas.

O oxigênio singlete, quando gerado, pode reagir com lipídeos insaturados (incluindo colesterol), aminoácidos (como o triptofano, histidina e metionina) e ácido nucléicos. Como lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, as reações fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido alvo via necrose ou apoptose (RIBEIRO et al., 2007; ZHU et al., 2007).

1.2 - Fontes de luz

Apesar do sistema mais utilizado ser o Laser Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, podem ser utilizadas lâmpadas de tungstênio ou halogênio, além dos equipamentos a base de diodos emissores de luz (LED – light emitting diode).

O laser é essencialmente um amplificador óptico, composto por meio ativo (sólido, líquido ou gás) responsável pela amplificação da luz, e uma cavidade óptica que consiste de espelhos especiais que confinam esta amplificação de luz. Esses meios ativos

apresentam emissão de luz quando excitados por uma fonte externa (elétrica ou óptica). O resultado é a saída de um feixe de radiação eletromagnética intensa, coerente e monocromática. Além disso, outra grande vantagem do laser é a possibilidade de acoplamento à fibra óptica que permite a irradiação de tumores profundos (VANDENBERGH, 1986).

Com o emprego de agentes fototerapêuticos de segunda geração, em virtude de sua alta absorvidade molar, o uso de diodos emissores de luz (LED – Light emitting diode) tem também se tornado viável, possibilitando uma redução no custo dos procedimentos e maior facilidade de operação devido à possibilidade de arranjos com grande número de LEDs para terapia em extensas lesões (MACHADO, 2000).

1.3 - Janela Terapêutica

A penetração da luz através dos tecidos é facilitada na região compreendida entre 600 e 1000nm. Os tecidos normais contêm muitas substâncias que absorvem ou refletem radiação eletromagnética. Proteínas e DNA absorvem na faixa do ultravioleta (200-350nm), a melanina absorve em comprimentos de onda entre 200 e 300nm e entre 315-400nm, e a hemoglobina absorve na região verde-amarelo do espectro visível (400-600nm). A água absorve na região do infravermelho (acima de 800nm). Assim, resta apenas uma faixa do espectro eletromagnético (600-1000nm) na qual os tecidos são relativamente transparentes (STAR et al., 1987). Esta faixa de comprimento de onda é conhecida como “janela terapêutica” e é preferencialmente utilizada em terapia fotodinâmica (WILSON; PATTERSON, 1990; JORI et al., 2006).

Atualmente diversos compostos com características para aplicação em terapia fotodinâmica estão sendo estudados, como as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, naftalocianinas, purpurinas e outros (SIMPLICIO et al., 2002).

1.4 - Características dos fotossensibilizadores

Um agente fototerapêutico clinicamente adequado deve possuir no seu estado triplete excitado um tempo de vida de longa duração ($\tau \geq 500$ ns) (OCHSNER, 1997), podendo reagir eficientemente tanto com moléculas vizinhas como com o oxigênio. Deve também apresentar elevada absorvidade molar na região espectral compreendida entre 600 e 1000 nm, possibilitando uma boa penetração da luz em tecidos levemente pigmentados, com risco mínimo de destruição generalizada dos componentes sadios que não contém o agente fototerapêutico (JORI et al., 2006; LEVY, 1995).

1.4.1 - Porphirinas

As porfirinas pertencem a uma classe distinta de compostos macrocíclicos vastamente encontrada na natureza possuindo importantes funções no metabolismo dos seres vivos e como sítios ativos em diversos processos biológicos como na ligação e transporte de oxigênio (mioglobina e hemoglobina), fotossíntese (clorofila) e transferência de elétrons (citocromo c) (BONNETT, 1995).

São muito utilizadas na Terapia Fotodinâmica como agente fotossensibilizador por possuir intensa absorção óptica, alta estabilidade química e fotoquímica, ação catalítica e alta afinidade a se agregar o que leva a formação de estruturas do alto nível de organização, além da alta afinidade com estruturas biológicas (STERNBERG, 1998).

1.4.2 - Clorinas

As clorinas são porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região 640-700nm. A clorina e_6 é uma forma derivada da clorofila-a e apresenta importantes propriedades que a viabiliza como fotossensibilizador em potencial, como alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (PASS, 1993; RESHENTNICKOV et al., 2000) e intensa absorção em comprimentos de ondas maiores, nos quais os tecidos biológicos são mais transparentes à luz (610-630nm) (RESHENTNICKOV et al., 2000).

1.5 - Histórico da Pitiose

A Pitiose é uma doença emergente e observa-se que o número de casos vem aumentando nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (KAUFMAN, 1998). A infecção no hospedeiro se dá pela penetração dos zoósporos biflagelados presentes em ambiente aquático (MENDOZA et al. 1993). Caracteriza-se pelo acometimento do tecido cutâneo e subcutâneo (TRISCOTT, 1993), com o desenvolvimento de lesões de natureza granulomatosa. O envolvimento sistêmico também pode ser observado e é caracterizado principalmente por quadros de oclusão arterial. Esta doença se não tratada em seus estágios iniciais pode levar o paciente à morte, pois é de difícil tratamento (MENDOZA et al., 1996).

Acomete diversas espécies animais, incluindo a humana, sendo a espécie eqüina a mais afetada (MENDOZA et al., 1993). No homem, a doença pode se manifestar nas formas oftálmica, cutâneo-subcutânea ou sistêmica, sendo as duas últimas, comuns em indivíduos talassêmicos (TRISCOTT et al., 1993). Os primeiros casos de pitiose humana ocorreram em 1985, na Tailândia, região endêmica e de maior prevalência mundial da doença em humanos

(DE COCK et al., 1987, IMWIDTHAYA, 1994, PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; TRISCOTT et al., 1993). Desde então, casos de pitiose humana têm sido cada vez mais relatados, inclusive em áreas onde o agente era conhecido somente como patógeno animal, como na Costa Rica, EUA, Nova Zelândia, Malásia, Austrália e Haiti (KRAJAEJUN et al., 2006; MENDOZA et al., 1996; PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003). A pitiose humana acomete principalmente indivíduos do sexo masculino com atividade ocupacional relacionada à agricultura e na faixa etária entre 20 e 60 anos, sendo comumente relatada em plantadores de arroz (KRAJAEJUN et al., 2006a; KRAJAEJUN et al., 2006b) e apresenta alto índice de morbidade e mortalidade, chegando o último a 100% nos casos de acometimento vascular ou sistêmico, principalmente entre indivíduos talassêmicos (THIANPRASIT et al., 1996).

No Brasil, Santos e Londero (SANTOS; LONDERO, 1974), relataram o primeiro caso de pitiose, na espécie eqüina, no Rio Grande do Sul. Hoje a doença em eqüinos se encontra amplamente distribuída pelo território nacional, tendo sido descrita no Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, São Paulo, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia (CARVALHO et al., 2000; CARVALHO et al., 1984; GUEDES et al., 1998; HEADLEY; ARRUDA, 2004; LEAL et al., 2001; TABOSA et al., 1999). O Pantanal Matogrossense é uma região endêmica e, provavelmente, a de maior ocorrência mundial de pitiose eqüina (LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006).

Além da espécie eqüina, a doença, no Brasil, já foi também relatada em bovinos no Mato Grosso (SANTURIO et al., 1998) e, recentemente, foi descrito um surto na espécie ovina, no Estado da Paraíba, no qual houve a morte de 36 animais durante um período de 240 dias. Os animais afetados permaneceram por longos períodos em regiões alagadas, onde a pastagem era mais abundante (TABOSA et al., 2004). Em 1997, foi relatado o primeiro caso de pitiose canina no Brasil, uma fêmea com lesão cutânea no membro

posterior direito, proveniente do Estado de São Paulo. Mais tarde, foram descritos outros dois casos de pitiose entérica no Estado do Rio Grande do Sul (LARSON et al., 1997; RECH et al., 2004; RIET-CORRÊA et al., 1998).

Embora a maioria dos casos de pitiose no Brasil refere-se a animais, em especial aos eqüinos, a doença foi recentemente diagnosticada em humanos (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006).

1.5.1 - Característica do *Pythium insidiosum*

Pythium insidiosum, agente etiológico da pitiose, é um oomiceto, ou seja, um microrganismo com características morfológicas e ecológicas semelhantes a fungos, porém não são considerados fungos verdadeiros. Recentemente, este microrganismo foi agrupado junto ao Reino Stramenopila (ALEXOPOULOS et al., 1996). Os oomicetos diferem dos fungos verdadeiros, dentre outras características, pela composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto o *Pythium* contém celulose. A membrana plasmática não contém esteróides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas (ALLISON; GILLIS et al., 1990).

1.6 - Tratamentos convencionais da Pitiose

O tratamento convencional da pitiose é a remoção cirúrgica, com excisão de toda a área afetada, respeitando-se uma margem de segurança para evitar recidivas. Esse tipo de tratamento se torna impraticável, em alguns casos, devido às estruturas anatômicas

envolvidas na área da lesão, sendo indicado, com bons resultados, somente em casos de lesões pequenas e superficiais (MENDOZA et al., 1992; MILLER, 1981).

Os compostos utilizados em plantas, para combater os fitopatógenos do gênero *Pythium*, são tóxicos aos mamíferos, não podendo ser usados no tratamento da pitiose (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989).

Sedrish (1997) relatou o sucesso do tratamento da pitiose usando, após a remoção cirúrgica da lesão, raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio.

A imunoterapia, proposta por Miller (1981), é uma alternativa interessante para o tratamento da pitiose. Esse tipo de tratamento vem sendo amplamente utilizado em eqüinos, porém com resultados variados. Fatores individuais como anergia em casos crônicos e ausência de estimulação em casos agudos podem explicar o variável índice de eficiência da imunoterapia (MILLER; CAMPBELL, 1982). Em alguns animais imunocomprometidos, as lesões e o quadro clínico evoluem para o óbito, em função da incapacidade de produzir anticorpos.

No tratamento químico as drogas mais utilizadas até o momento foram anfotericina B, cetoconazole, miconazole, fluconazole e intraconazole, além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e sódio (SANTURIO et al., 2006). McMULLAN e colaboradores (1977) obtiveram 50% de eficiência associando remoção cirúrgica e anfotericina B; 30% apenas com anfotericina B e 20% das fomicoses subcutâneas não responderam ao tratamento.

O sucesso das diferentes formas de tratamento é variável, sendo em muitos casos influenciados pelo tamanho e duração da lesão, idade e estado nutricional do animal.

1.6.1 - Anfotericina B

O espectro de ação da anfotericina B é amplo, incluindo *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Rhodotorula*, *Blastomyces dermatidis*, *Paracoccidioides braziliensis*, *Aspergillus* e *Sporothrix*. Trata-se de um composto poliênico contendo uma porção hidrófila e uma sequência de quatro a sete ligas duplas conjugadas com característica físico-química lipolífica (TOLINS e RAIJ, 1988).

O mecanismo de ação da Anfotericina B está associada a suas características físico-químicas e à interação com as membranas fúngicas. Todos os fungos e outros micro-organismos suscetíveis a fármacos poliênicos, como algas e alguns protozoários, possuem em sua membrana celular ergosterol. Esta característica faz do anfotericina B a droga antifúngica mais prescrita, com maior espectro de ação e de escolha para fungemias (MANDELL e PETRI, 1996; PATEL, 1998; SAWAYA et al., 1995)

Esta droga apresenta inúmeros efeitos adversos como febre, calafrio, náusea, vômitos, cefaléia, e mais raramente, choque anafilático, arritmias cardíacas, insuficiência hepática, “flushing”, flebite, mialgias e convulsões. (TOLINS e RAIJ, 1988; ARNING e SCHARF, 1989; LLANOS et al., 1991).

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a ação do efeito fotodinâmico sobre o isolado de *P. insidiosum* obtido de caso de piotise humano (B01).

2.2 - Objetivos específicos

- padronizar uma metodologia de avaliação de crescimento *in vitro* do isolado;
- avaliar o efeito dos agentes fotossensibilizadores (porfirina e clorina) isoladamente sobre o crescimento do isolado;
- avaliar o efeito luminoso isoladamente sobre o crescimento do isolado;
- avaliar o efeito da Anfotericina B sobre o crescimento *in vitro* do isolado;
- determinar melhores parâmetros de fotossensibilização (tipo de agente fotossensibilizador e concentração) e de iluminação (dose de energia);
- comparar os resultados da Terapia Fotodinamica com a Anfotericina B.

Capítulo 2 - Avaliação do Efeito Fotodinâmico Sobre o Crescimento *in vitro* de *Pythium insidiosum* utilizando a porfirina como agente fotossensibilizador

1 - Metodologia

1.1 - Isolados e padronização dos fragmentos

Foi empregado isolado de *Pythium insidiosum* obtido do primeiro caso de pitiose humana do Brasil (B01) (BOSCO et al. 2005, MARQUES et al., 2006), atendido no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

O patógeno foi mantido por meio de subcultivos quinzenais em tubos contendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com incubação a 35°C. Para a realização dos ensaios, fragmentos de 5mm de diâmetro foram retirados dos bordos das culturas do isolado e semeados em placas de Petri contendo SDA com incubação a 35°C por 48h. Para a padronização dos fragmentos foram utilizadas ponteiras de 1000µL cortadas em sua extremidade na medida de 5mm. Uma vez as ponteiras cortadas, estas foram embaladas individualmente e autoclavadas para posterior utilização.

1.2 - Agente fotossensibilizador

Foi utilizado como agente fotossensibilizador a Porfirina (Photogem®, Photogem – Moscou, Rússia), obtida em colaboração com a Profa. Dra. Cristina Kurachi (Instituto de Física, USP – São Carlos).

1.3 - Fonte luminosa

Foram utilizados equipamentos constituídos por LEDs emitindo em 530nm e 630nm em colaboração com a Profa. Dra. Cristina Kurachi (LAT – Laboratório de Apoio Tecnológico, CEPOF – IFSC/USP).

1.4 - Avaliação da ação dos fotossensibilizadores sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

A fim de se estabelecer se a porfirina, isoladamente, exerceu efeito sobre o crescimento de *P. insidiosum*, fragmentos padronizados do isolado foram semeados em placas de Petri contendo SDA. Foram adicionados 10µL do fotossensibilizador nas concentrações de 1, 5, 10 e 25mg/L de maneira a cobrir totalmente os fragmentos semeados e mantidos em estufa a 35°C. Esses fragmentos foram avaliados e fotografados nos períodos de 24, 120 e 240h. Paralelamente foi realizado teste controle utilizando solução salina estéril 0,85%. Todos os experimentos foram realizados com cinco repetições.

1.5 - Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

A fim de se estabelecer se a energia luminosa isoladamente exerceu efeito fungicida e/ou fungistático sobre o patógeno, fragmentos padronizados do mesmo foram semeados em placas de Petri contendo SDA e expostos a doses energéticas de 10, 30, 50, 70 e 100J/cm², com comprimentos de onda de 530 e 630nm. Foi realizado paralelamente, um controle que consistiu no subcultivo de fragmentos do patógeno em meio SDA com

incubação a 35°C, os quais não receberam luz para certificar o crescimento natural do patógeno. Todos os experimentos foram realizados em cinco repetições.

1.6 - Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

Para analisar a eficiência do efeito fotodinâmico, foram utilizadas diferentes concentrações da porfirina (1, 5, 10 e 25mg/mL), combinados com diferentes dosagens energéticas (10, 30, 50, 70 e 100J/cm²). Para tanto, fragmentos padronizados do patógeno foram semeados em placas de Petri contendo SDA. A seguir, adicionou-se 10µL do agente fotossensibilizador, nas diferentes concentrações. Após a administração do fotossensibilizador aguardou-se um período de pré-exposição de aproximadamente 20 minutos em estufa a 35°C ao abrigo da luz. Passado esse período, os fragmentos foram então expostos a diferentes doses energéticas, com a finalidade de se obter os melhores parâmetros de inibição do crescimento do patógeno. Concomitantemente foi realizado um controle, no qual consistiu do subcultivo dos fragmentos do patógeno em placas com SDA para certificar da viabilidade dos isolado. Tanto os tratamentos quanto os controles foram realizados com cinco repetições e mantidos a 35°C.

Os resultados foram analisados em estereomicroscópio S8APO-Leica® e as imagens foram coletadas com o auxílio do Software Image Manager-IM50 Leica®.

1.7 - Análise dos resultados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os fragmentos submetidos aos testes anteriores que apresentaram os melhores resultados, assim como os controles, foram submetidos à análise de Microscopia Eletrônica

de Varredura a fim de se avaliar a morfologia das hifas. Este teste foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu (Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200 Fei Company®).

2 - Resultados

2.1 - Avaliação da ação dos fotossensibilizadores sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

Observou-se que todas as concentrações avaliadas não exerceram efeitos tóxicos que pudessem interferir no crescimento do isolado. Dessa maneira, será ilustrada na Figura 2-1 a maior concentração de porfirina (25mg/mL) testada e analisada nos períodos de 24, 120 e 240h.

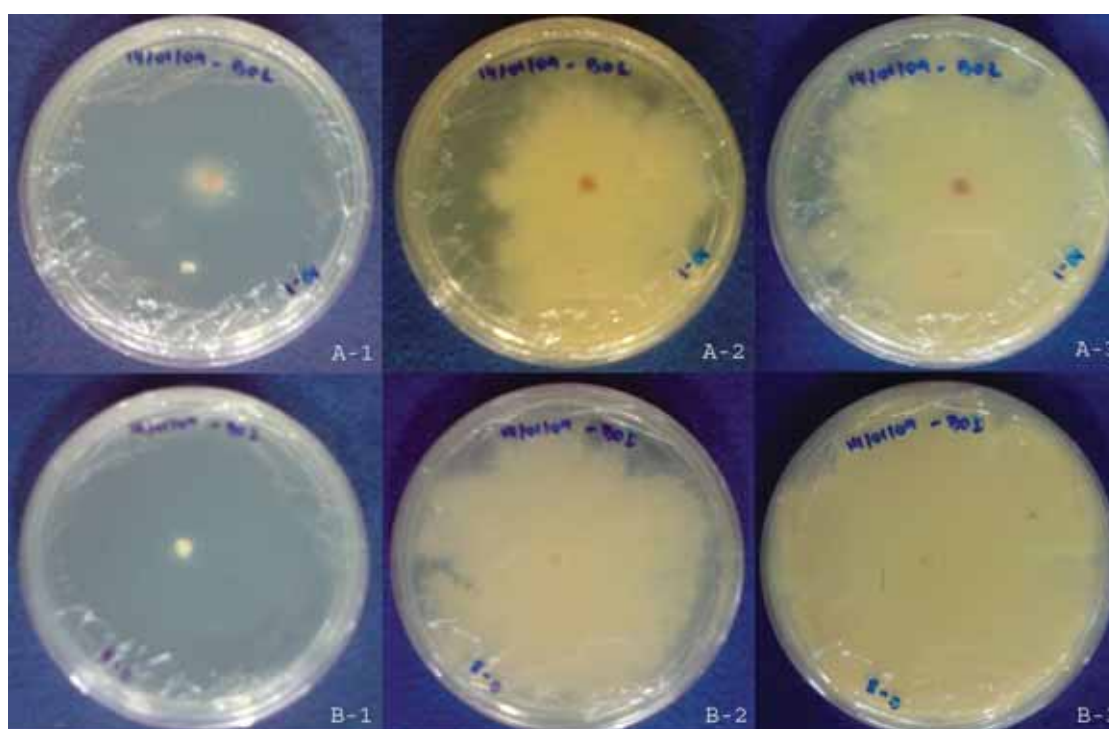


Figura 2-1. Imagem comparativa das colônias de *Pythium insidiosum* B01 que receberam a porfirina na concentração de 25mg/mL com o grupo controle. As imagens indicadas com as letras A representam as colônias nas quais a porfirina foi aplicada e as indicadas com a letra B representam o grupo controle. Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 120 e 240h, respectivamente.

2.2 – Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

Observou-se que todas as doses energéticas empregadas, tanto em 530 como 630nm, (10, 30, 50, 70 e 100J/cm²) não exerceram efeitos inibitórios sobre o crescimento do isolado. Da mesma maneira, será apresentada na Figura 2-2 a maior dose energética empregada, com iluminação em 530nm .

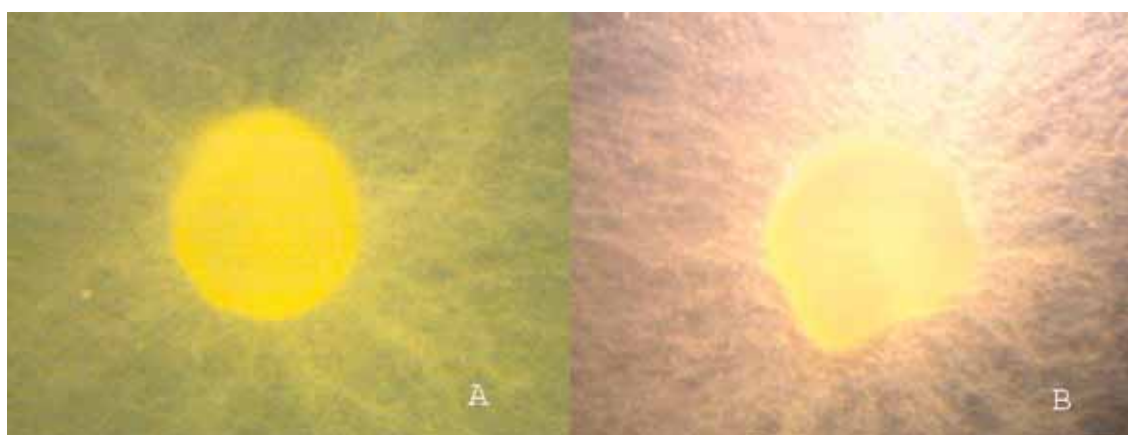


Figura 2-2. Imagem comparativa do crescimento do isolado de *Pythium insidiosum* B01 referente ao grupo controle (A) e ao grupo que foi irradiado com 100J/cm²(B).

2.3 – Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento *in vitro* de isolado de *Pythium insidiosum*

Os melhores resultados foram obtidos empregando-se porfirina na concentração de 25mg/mL e irradiados com 100J/cm². Observou-se que três das cinco repetições não apresentaram crescimento. As outras duas repetições apresentaram discreto crescimento de hifas, como pode ser observado na Figura 3.

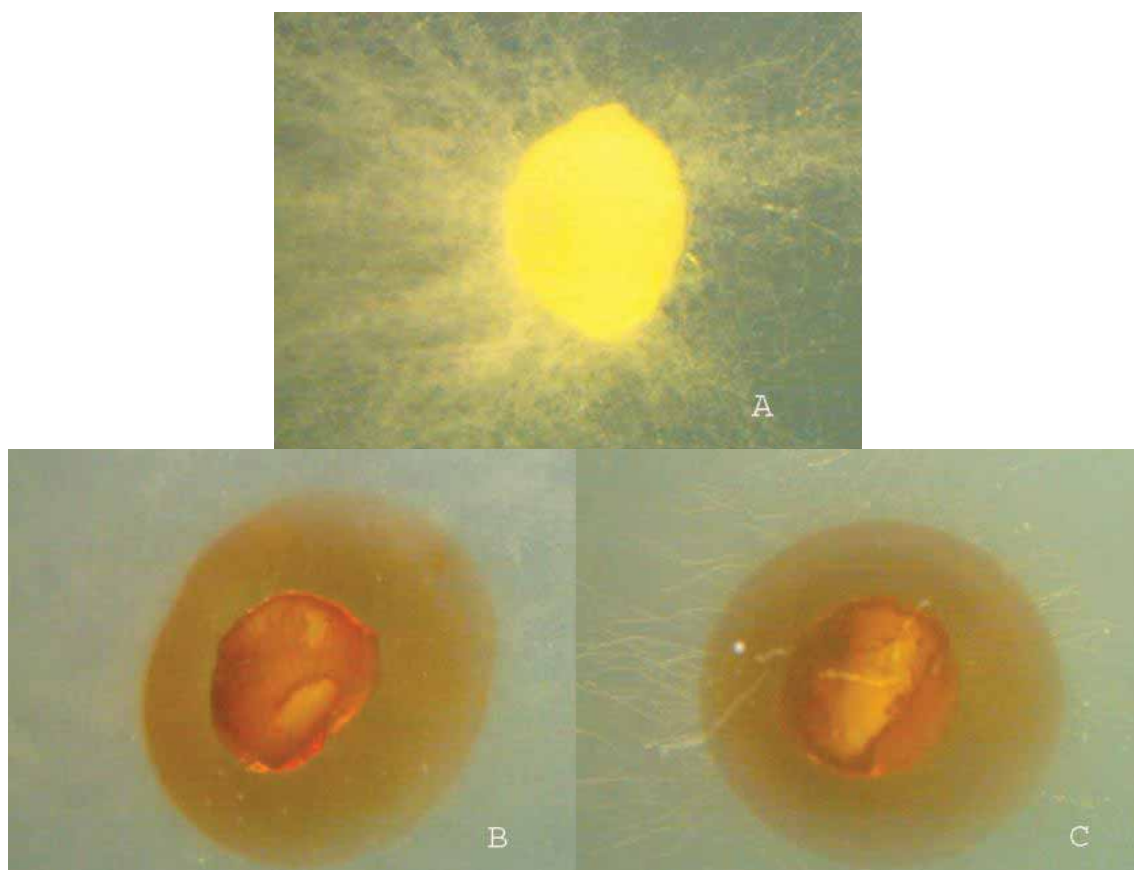


Figura 2-3. Imagem comparativa dos resultados obtidos do efeito fotodinâmico sobre o crescimento do isolado de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) e do grupo que foi irradiado com $100\text{J}/\text{cm}^2$ (530nm) e fotossensibilizador na concentração de 25mg/mL. (B) ausência de crescimento e (C) discreto crescimento.

2.4 - Análise dos resultados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A partir das imagens obtidas na análise de MEV observou-se que as hifas do grupo controle apresentaram-se ramificadas, cilíndricas e largas, como esperado para o patógeno. Outro aspecto importante a ser mencionado é a integridade dessas hifas, uma vez que não se observou a deposição de material amorfo ao seu redor, como pode ser visto na Figura 2-4.

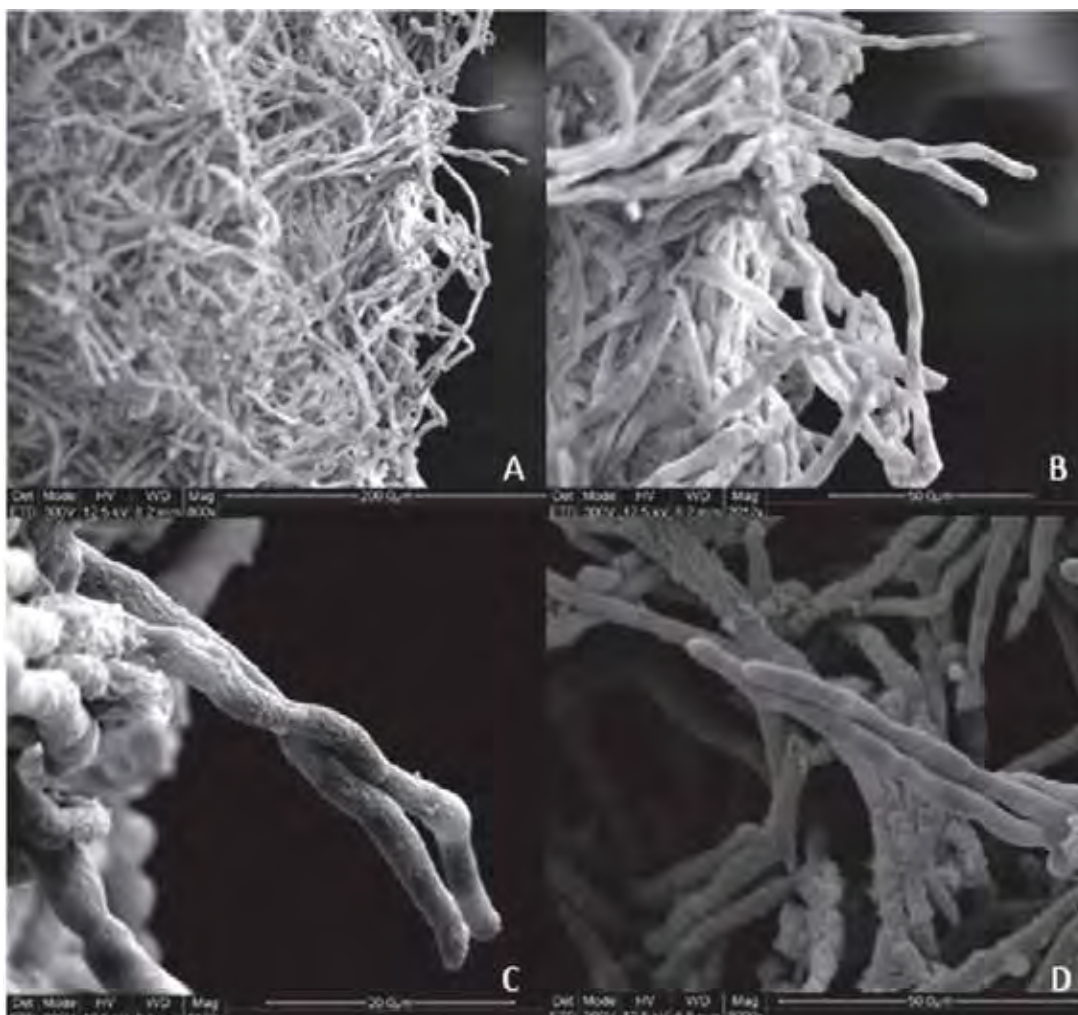


Figura 2-4. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das hifas de *Pythium insidiosum* do isolado B01 do grupo controle. (A) visão geral das ramificações das hifas do patógeno (800X); visão detalhada das hifas integras, largas e cilíndricas (B – 2012X; C – 6130X; D – 3000X)

As análises de MEV da ação da porfirina (25mg/mL) e do efeito luminoso ($100\text{J}/\text{cm}^2$), isoladamente, sobre as hifas do isolado B01 estão ilustradas nas Figuras 2-5 e 2-6, nas quais pode-se observar que são semelhantes às do grupo controle, comprovando a evidência de que não houve efeito deletério sobre o patógeno.

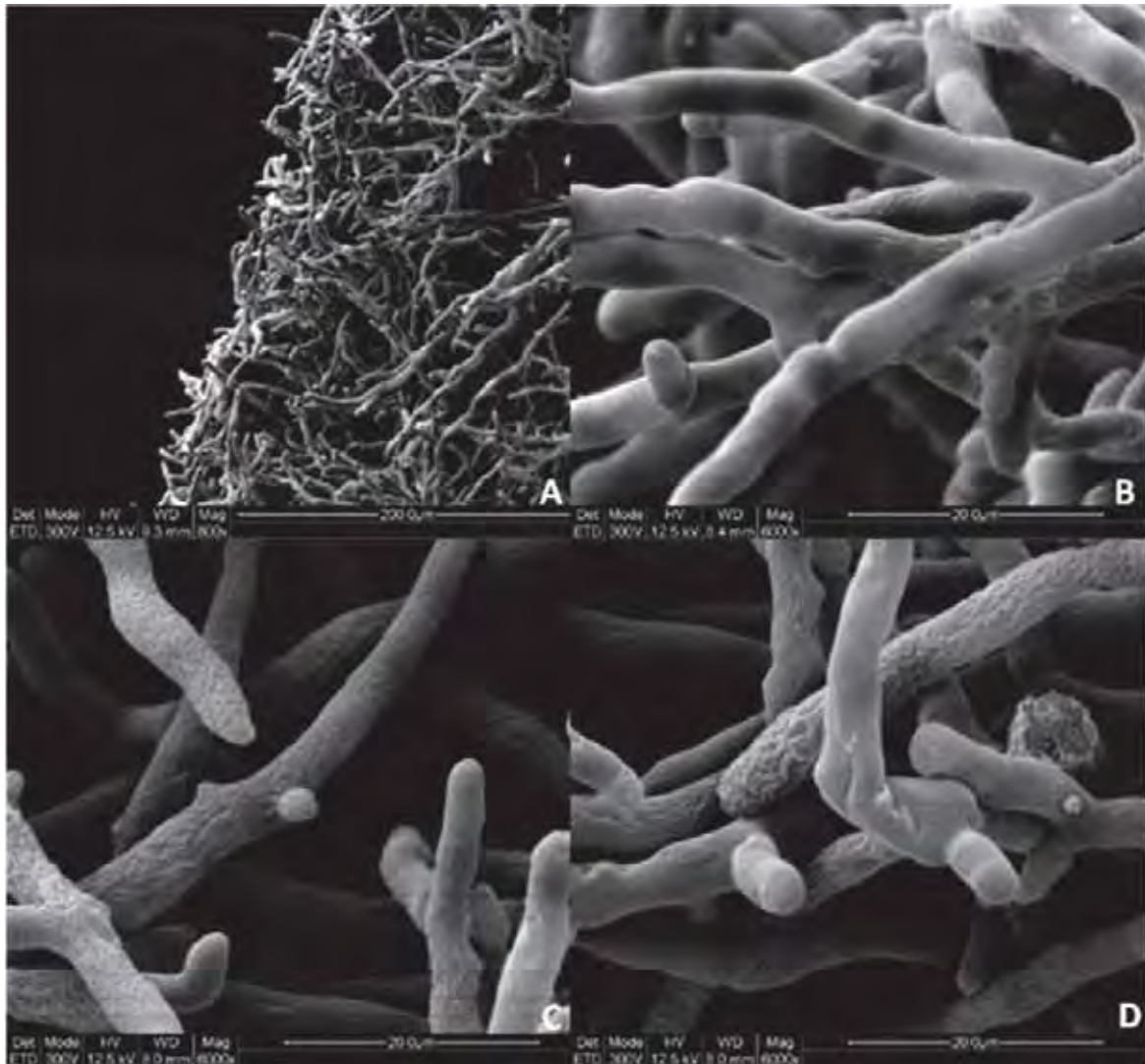


Figura 2-5. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das hifas de *Pythium insidiosum* do isolado B01 do grupo efeito luminoso (530nm - 100J/cm²). (A) visão geral das ramificações das hifas do patógeno (800X); visão detalhada das hifas integras, largas e cilíndricas (B, C e D 6000X).

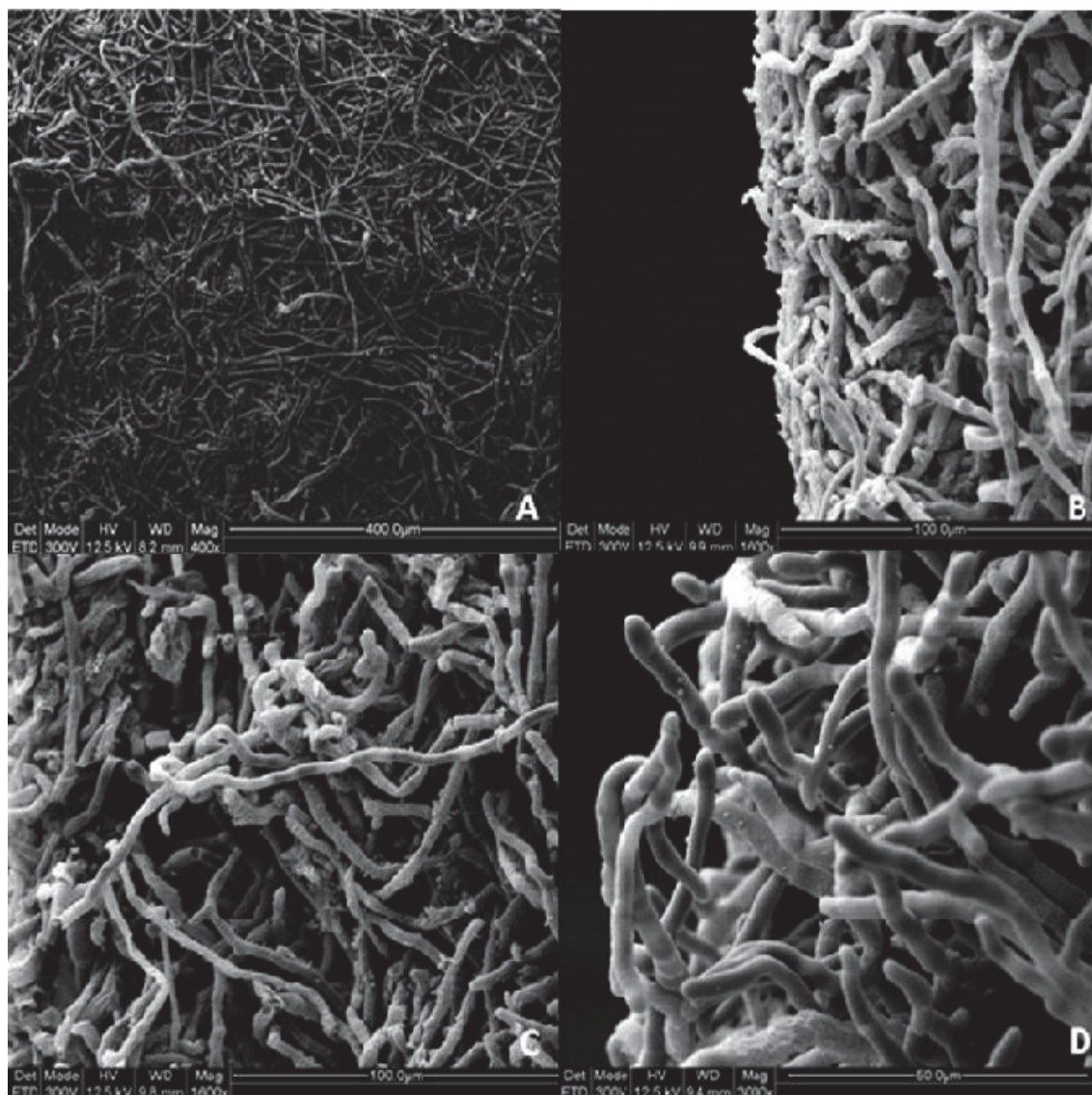


Figura 2-6. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das hifas de *Pythium insidiosum* do isolado B01 do grupo fotossensibilizador (porfirina – 25mg/mL). (A) visão geral das ramificações das hifas do patógeno (400X); largas e cilíndricas (B – 1600X; C – 1600X; D – 3000X).

Como mencionado anteriormente, a Figura 2-3 mostra a inibição e o crescimento discreto das hifas dos isolados. Esses resultados são comprovados pela análise de MEV, representada na Figura 2-7, onde se observa que houve a perda da integridade das hifas, provavelmente por danos em parede celular e membrana plasmática, uma vez que houve extravasamento de material amorfo.

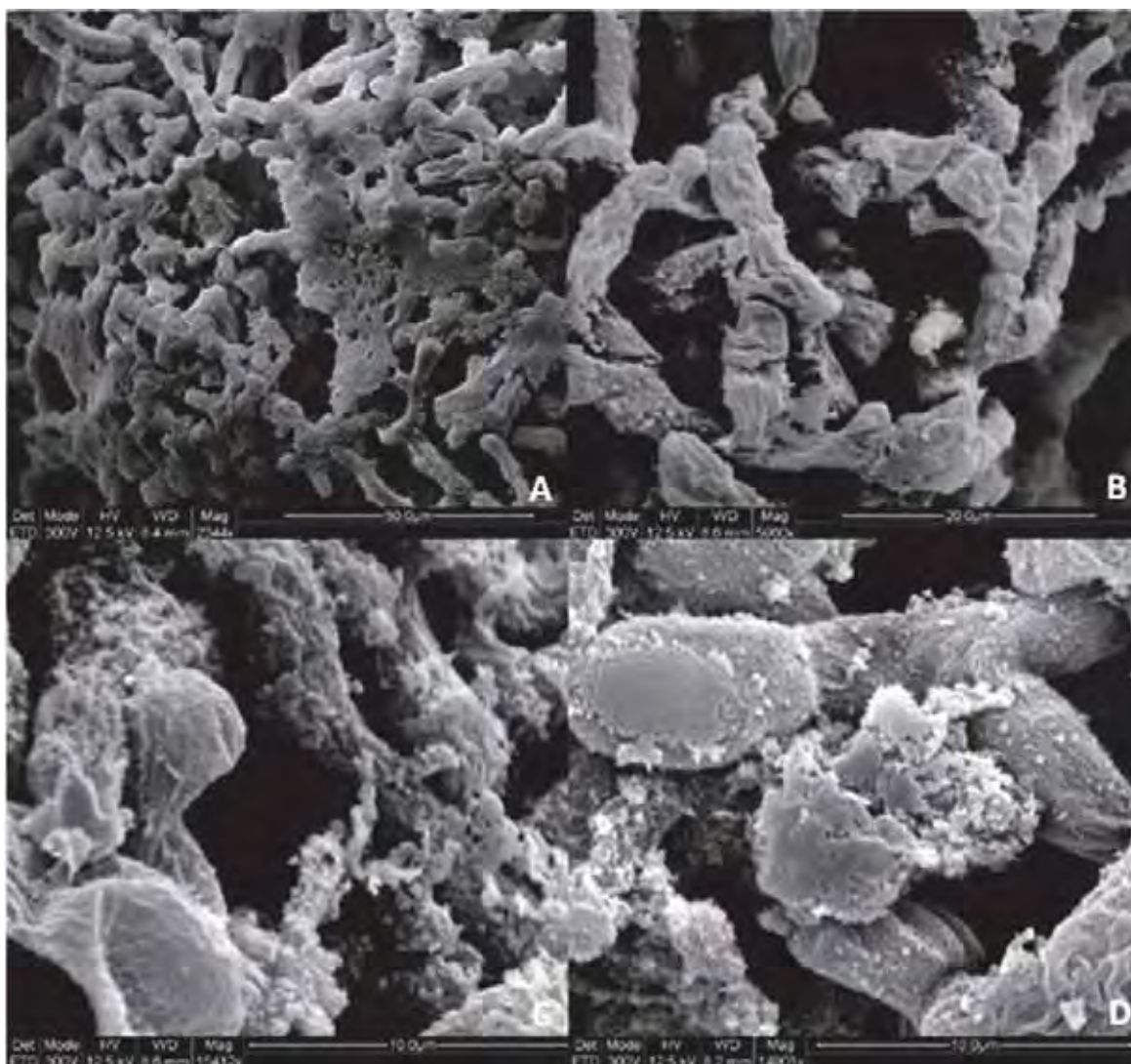


Figura 2-7. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das hifas de *Pythium insidiosum* do isolado B01 do grupo que recebeu o tratamento fotodinâmico (25mg/mL e 100J/cm²). (A) visão geral da perda de integridade das hifas e deposição de material amorfo (2344X). (B) hifas deformadas, com perda da morfologia cilíndrica e ruptura em alguns pontos (5960X). (C e D) Ênfase na deposição de material amorfo e deformidade das hifas (15412X e 14901X, respectivamente).

3 - Discussão

As concentrações de porfirina avaliadas são consideradas elevadas quando comparadas a relatos descritos por Bliss et al. (2004). Este fato se fez necessário devido à característica membranosa intrínseca ao *Pythium insidiosum*. A utilização de concentrações mais baixas poderia dificultar a penetração do fotossensibilizador, tornando-o inviável para

os estudos de PDT. Apesar das altas concentrações, analisando os resultados obtidos, conclui-se que a aplicação de porfirina nas concentrações analisadas, sem exposição à luz, não comprometeram o crescimento do patógeno *in vitro*. Não se observou também crescimento diferenciado entre as diversas concentrações utilizadas inter e intraindividuais.

Da mesma maneira, a avaliação do efeito luminoso não se mostrou deletéria para o crescimento do patógeno.

A Terapia Fotodinâmica mostrou-se eficaz principalmente quando utilizando a combinação de 25 mg/mL de porfirina e dose energética de 100 J/cm², fato comprovado com a observação macroscópica da ausência e crescimento discreto das hifas, bem como pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura que mostrou a perda da integridade da hifa com deposição de material amorfo.

Esta dose energética representa uma extrapolação para o estudo do comportamento da resposta do patógeno frente a esta nova técnica, uma vez que se trata de um ensaio piloto.

Apesar de preliminares, e até então pioneiros em se tratando desta abordagem para o *P. insidiosum*, estes resultados mostram-se promissores e representam uma nova perspectiva para o tratamento da pitiose.

Capítulo 3 - Avaliação do Efeito Fotodinâmico Sobre o Crescimento *in vitro* de *Pythium insidiosum* utilizando a clorina como agente fotossensibilizador

1 - Metodologia

1.1 - Isolados e padronização dos fragmentos

Foi empregado isolado de *Pythium insidiosum* obtido do primeiro caso de pitiose humana do Brasil (B01) (BOSCO et al. 2005, MARQUES et al., 2006), atendido no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

O patógeno foi mantido por meio de subcultivos quinzenais em tubos contendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com incubação a 35°C. Para a realização dos ensaios, fragmentos de 5mm de diâmetro foram retirados dos bordos das culturas dos isolados e semeados em placas de Petri contendo SDA com incubação a 35°C por 48h (colônia-mãe de 48h) e por 120h (colônia-mãe de 5 dias). Para a padronização dos fragmentos foram utilizadas ponteiras de 1000µL cortadas em sua extremidade na medida de 5mm. Uma vez as ponteiras cortadas, estas foram embaladas individualmente e autoclavadas para posterior utilização.

1.2 - Agente fotossensibilizador

Foi utilizado como agente fotossensibilizador a Clorina (Fotodinazin® – Moscou, Rússia), obtida em colaboração com a Profa. Dra. Cristina Kurachi (Instituto de Física, USP – São Carlos).

1.3 - Fonte luminosa

Foi utilizado um equipamento constituído por LEDs emitindo em 660nm em colaboração com a Profa. Dra. Cristina Kurachi (LAT – Laboratório de Apoio Tecnológico, CEPOF – IFSC/USP).

1.4 - Avaliação da ação dos fotossensibilizadores sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

A fim de se estabelecer se a clorina, isoladamente, exerceu efeito sobre o crescimento de *P. insidiosum*, fragmentos padronizados do isolado foram semeados em placas de Petri contendo SDA. Foram adicionados 10µL do fotossensibilizador nas concentrações de 0,7, 1,0 e 1,3mg/L de maneira a cobrir totalmente os fragmentos semeados e mantidos em estufa a 35°C. Esses fragmentos foram avaliados e fotografados nos períodos de 24h, 48h e 168h. Paralelamente foi realizado teste controle utilizando solução salina estéril 0,85%. Todos os experimentos foram realizados com cinco repetições.

1.5 - Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

A fim de se estabelecer se a energia luminosa isoladamente exerceu efeito fungicida e/ou fungistático sobre o patógeno, fragmentos padronizados do mesmo foram semeados em placas de Petri contendo SDA e expostos a doses energéticas de 30, 50, 70J/cm², com comprimento de onda de 660nm. Foi realizado paralelamente, um controle que consistiu no subcultivo de fragmentos do patógeno em meio SDA com incubação a 35°C,

os quais não receberam luz para certificar o crescimento natural do patógeno. Todos os experimentos foram realizados em cinco repetições.

Os resultados foram comparados com o controle e fotografados com 24, 48 e 168h após a realização da irradiação.

1.6 - Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

Foram realizados ensaios de terapia fotodinâmica utilizando concentrações de clorina de 0,7, 1,0 e 1,3mg/mL, e doses de luz de 30, 50 e 70 J/cm² combinadas entre si. Os tratamentos estão esquematizados na Tabela 3-1.

Fragmentos padronizados do isolado foram semeados em placas de Petri contendo meio SDA e adicionado 10µL de clorina, cobrindo todos os fragmentos. Aguardou-se o tempo de pré-irradiação, que neste processo foi de 20 minutos, em estufa a 35°C ao abrigo da luz. Passado este período, iniciou-se a irradiação. Os resultados foram comparados com o controle e fotografados com 24, 48 e 168h após a realização da terapia fotodinâmica. O teste foi realizado com 5 repetições.

Tabela 3-1. Protocolos de Terapia Fotodinâmica, empregando-se várias concentrações de clorina e doses energéticas, utilizados para o isolado de *Pythium insidiosum* B01.

Tratamento	Concentração clorina (mg/mL)	Dose energética (J/cm ²)	Idade colônia- mãe
PDT1	0,7	30	48h
	1,0		
	1,3		
PDT2	0,7	50	48h
	1,0		
	1,3		
PDT3	0,7	70	48h
	1,0		
	1,3		
PDT4	0,7	30	5 dias
	1,0		
	1,3		
PDT5	0,7	50	5 dias
	1,0		
	1,3		
PDT6	0,7	70	5 dias
	1,0		
	1,3		

1.7 - Avaliação do efeito da Anfotericina B sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

Fragmentos padronizados do isolado de *P. insidiosum* foram semeados em placas de Petri contendo SDA. Foram adicionados 10µL de Anfotericina B nas concentrações de 25, 50 e 100µg/mL de maneira a cobrir totalmente os fragmentos semeados e mantidos em estufa a 35°C. Esses fragmentos foram avaliados e fotografados nos períodos de 24h, 48h e 168h. Paralelamente foi realizado teste controle utilizando solução salina estéril 0,85%. Todos os experimentos foram realizados com cinco repetições.

1.8 - Análise dos resultados

Todos os ensaios foram fotografados após 24, 48 e 168h. Este procedimento foi realizado na Seção de Fotografia da UNESP/Botucatu, de maneira a obter fotos padronizadas das culturas tratadas e dos grupos controle, a fim de possibilitar a medição dos diâmetros, utilizando-se o software ImageJ® (Figura 3-1). Para cada imagem obtida foram realizadas quatro medidas de diâmetro em mm, com ângulos de 0, 45, 90, e 135°. Para que as medidas realizadas fossem confiáveis, foi utilizada uma referência de 10mm em cada placa de Petri a fim de padronizar a escala para análise no Software.

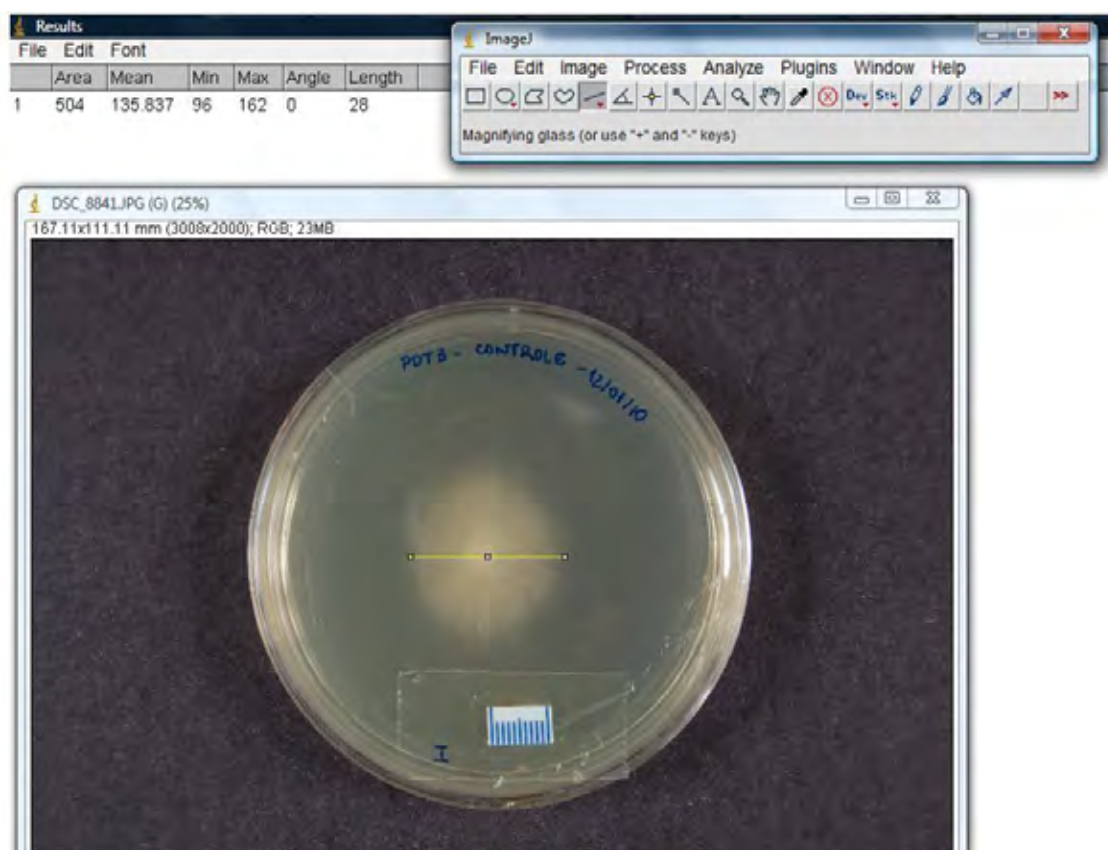


Figura 3-1. Representação da utilização do Software ImageJ® para obtenção das medidas de diâmetro das colônias de *Pythium indisiosum*.

A partir da tabulação das medidas dos diâmetros das colônias realizou-se a análise estatística pelo teste de análise de variância (ANOVA), em colaboração com a Prof. Dra. Miriam Tsunemi, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP. Na análise estatística foram comparadas as dimensões centrais obtidas em cada nível para cada momento 0, 24, 48 e 168h separadamente. Nos casos em que a suposição de normalidade não fosse rejeitada, aplicou-se o teste de análise de variância (ANOVA). Caso a suposição de normalidade não fosse adequada, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Os valores destacados em vermelho indicam que há uma diferença significativa do diâmetro central entre os respectivos níveis para determinado momento. Nestes casos, seguiu-se com as comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa.

Além destas análises calculou-se a Taxa de Inibição de cada tratamento para as primeiras 24h de crescimento do patógeno, como Equação 1.

$$TI(\%) = 100 - \left[\frac{(T \cdot 100)}{C} \right], \quad \text{Equação 1.}$$

Em que, TI é a Taxa de Inibição em porcentagem, T é a média dos diâmetros das colônias (mm) para cada tratamento, e C é a média dos diâmetros das colônias (mm) para o grupo controle.

2 - Resultados

2.1 - Avaliação do efeito da clorina sem exposição à luz sobre o crescimento do isolado de *Pythium insidiosum*

Observou-se que todas as concentrações avaliadas não exerceram efeitos tóxicos para nenhuma das colônias que pudessem interferir no crescimento do isolado. Dessa

maneira, será ilustrada na Figura 3-2 a maior concentração de clorina (1,3mg/mL) testada nos períodos de 24, 48 e 168h.

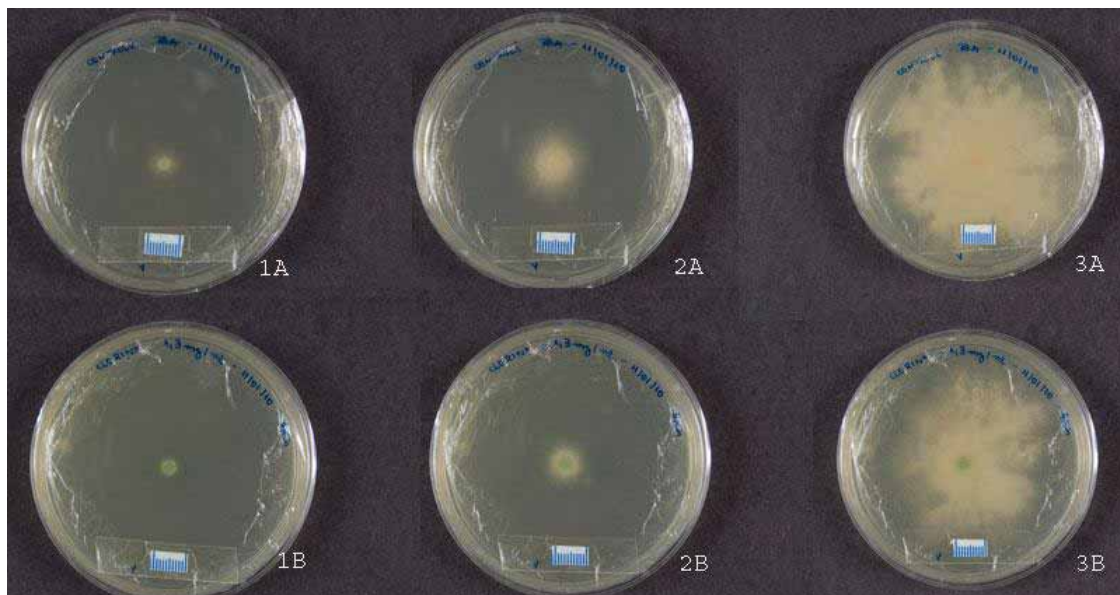


Figura 3-2. Imagem comparativa das colônias de *Pythium insidiosum* B01 que receberam clorina na concentração de 1,3mg/mL com o grupo controle. As imagens indicadas com as letras A representam o grupo controle e as indicadas com a letra B representam o grupo que recebeu clorina. Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente.

Para comprovar o resultado obtido macroscopicamente foi realizada análise estatística por análise de variâncias, ilustrado na Tabela 3-2.

Tabela 3-2. Análise estatística dos ensaios realizados apenas com a clorina no isolado B01 com colônia-mãe de 48h.

Momento	Clorina	N	Média	Desvio Padrão	p-valor Anova	p-valor K-W
0h	Controle	5	4.76	0.23	0.188	-
	0,7	5	4.90	0.13		
	1,0	5	4.62	0.40		
	1,3	5	5.09	0.45		
	Total	20	4.84	0.35		
24h	0	5	9.64	0.88	0.408	-
	1	5	9.62	1.51		
	2	5	9.59	1.11		
	3	5	8.53	1.21		
	Total	20	9.34	1.20		
48h	0	5	24.15	1.67	-	0.048
	1	5	24.39	0.67		
	2	5	23.36	1.69		
	3	5	20.50	2.44		
	Total	20	23.10	2.25		
168h	0	5	67.87	5.14	0.135	-
	1	5	65.61	6.34		
	2	5	62.25	3.94		
	3	5	60.13	5.33		
	Total	20	63.96	5.71		

Tabela 3-3. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-2.

Comparações Student-Newman-Keuls	p-valor
Grupos Controle e 0,7mg/mL	0,873
Grupos Controle e 1,0mg/mL	0,487
Grupos Controle e 1,3mg/mL	0,019

Tabela 3-4. Análise estatística dos testes realizados apenas com a clorina no isolado B01 com colônia-mãe de 5 dias.

Momento	Clorina	N	Média	Desvio Padrão	p-valor Anova	p-valor K-W
0h	Controle	5	4.68	0.43	0.543	-
	0,7	5	4.85	0.17		
	1,0	5	4.93	0.33		
	1,3	5	5.04	0.52		
	Total	20	4.87	0.38		
24h	Controle	5	9.34	1.15	0.783	-
	0,7	5	8.80	0.96		
	1,0	5	8.56	0.74		
	1,3	5	8.71	1.90		
	Total	20	8.85	1.20		
48h	Controle	5	19.94	2.36	-	0.815
	0,7	5	19.37	0.78		
	1,0	5	17.94	3.26		
	1,3	5	17.90	5.06		
	Total	20	18.79	3.13		
168h	Controle	5	62.42	5.40	-	0.231
	0,7	5	62.70	1.51		
	1,0	5	56.34	8.07		
	1,3	5	58.52	7.33		
	Total	20	59.99	6.26		

A partir da análise das Tabelas 3-2, 3-3 e 3-4 é possível comprovar o que foi observado macroscopicamente. Apesar de no momento 48h para colônia-mãe de 48h (Tabela 3-2) o $p < 0,05$, este fato demonstra uma tendência e não uma significância estatística.

2.2 - Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento dos isolado de *Pythium insidiosum*

Observou-se que todas as doses energéticas empregadas (30, 50 e 70J/cm²) não exerceram efeitos inibitórios sobre o crescimento do isolado. Dessa forma, será apresentada na Figura 3-3 a maior dose energética, com iluminação em 660nm.

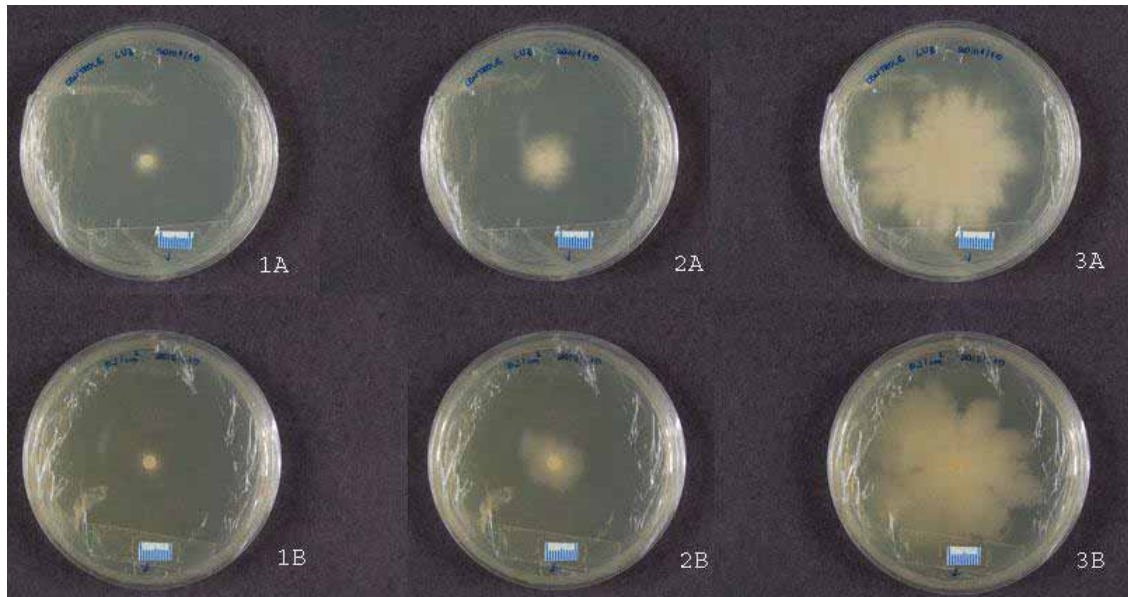


Figura 3-3. Imagem comparativa das colônias de *Pythium insidiosum* B01 que foram irradiadas com o grupo controle. As imagens indicadas com as letras A representam o grupo controle e as indicadas com a letra B representam o grupo que foi irradiado com $70\text{J}/\text{cm}^2$. Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente.

Tabela 3-5. Análise estatística dos testes realizados apenas com a luz (660nm) no isolado B01 com colônia-mãe de 48h.

Momento	Dose		Média	Desvio Padrão	p-valor Anova
	Energética	N			
0h	Controle	5	4.80	0.30	0.190
	30	5	4.81	0.20	
	50	5	4.51	0.21	
	70	5	4.69	0.20	
	Total	20	4.70	0.24	
24h	Controle	5	9.51	0.53	0.264
	30	5	8.55	0.55	
	50	5	9.62	1.41	
	70	5	9.32	0.81	
	Total	20	9.25	0.93	
48h	Controle	5	19.42	0.58	0.047
	30	5	18.73	0.74	
	50	5	18.33	0.50	
	70	5	19.26	0.61	
	Total	20	18.94	0.72	
168h	Controle	5	58.23	1.10	0.054
	30	5	59.92	2.48	
	50	5	61.54	1.80	
	70	5	61.15	1.87	
	Total	20	60.21	2.17	

Tabela 3-6. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-5.

Variável	Luz	Luz	Diferença de Médias	p-valor	IC 95%	
					LI	LS
48h	30	Controle	-0.70	0.214	-1.71	0.31
	50	Controle	-1.09	0.033	-2.10	-0.08
	70	Controle	-0.16	0.953	-1.17	0.85

Ao comparar as dimensões centrais obtidas em cada nível de Luz (controle, 30J/cm², 50 J/cm² ou 70 J/cm²) para cada momento 0, 24, 48 e 168h separadamente, observou-se que para o momento de 48h houve diferença estatística. A fim de detectar os

grupos que apresentaram diferença de diâmetro significativa, realizou-se as comparações múltiplas (Tabela 3-6).

Após esta segunda avaliação, observou-se que a diferença significativa de diâmetro foi entre o grupo controle e o grupo irradiado com $50\text{J}/\text{cm}^2$. Essa alteração não demonstra efeito fungicida ou fungistático sobre o crescimento do patógeno, uma vez que na maior dose energética ($70\text{J}/\text{cm}^2$) não houve diferença significativa de diâmetro.

Tabela 3-7. Análise estatística dos testes realizados apenas com a luz (660nm) no isolado B01 com colônia-mãe de 5 dias.

Momento	Dose Energética	N	Média	Desvio Padrão	p-valor Anova	p-valor K-W
0h	Controle	5	4.14	0.44	0.452	-
	30	5	4.44	0.33		
	50	5	4.42	0.35		
	70	5	4.45	0.24		
	Total	20	4.36	0.35		
24h	Controle	5	8.78	1.22	0.279	-
	30	5	8.52	0.51		
	50	5	8.14	0.80		
	70	5	7.73	0.77		
	Total	20	8.29	0.89		
48h	Controle	5	18.84	2.06	0.160	-
	30	5	19.62	0.84		
	50	5	18.82	2.33		
	70	5	17.13	0.89		
	Total	20	18.61	1.79		
168h	Controle	5	54.55	3.18	-	0.880
	30	5	56.71	7.72		
	50	5	55.47	2.82		
	70	5	56.19	0.37		
	Total	20	55.73	4.13		

Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que as doses energéticas de $30\text{J}/\text{cm}^2$, $50\text{J}/\text{cm}^2$ e $70\text{J}/\text{cm}^2$ não exercem efeito inibitório sobre o crescimento do micro-organismo.

2.3 - Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento dos isolados de *Pythium insidiosum*

De uma maneira geral, todos os tratamentos de PDT para as colônias-mãe de 48h e 5 dias evidenciaram macroscopicamente uma significativa redução e/ou inibição completa no crescimento das culturas de *P. insidiosum*, como demonstrado em alguns exemplos, nas Figuras 3-4, 3-5 e 3-6.

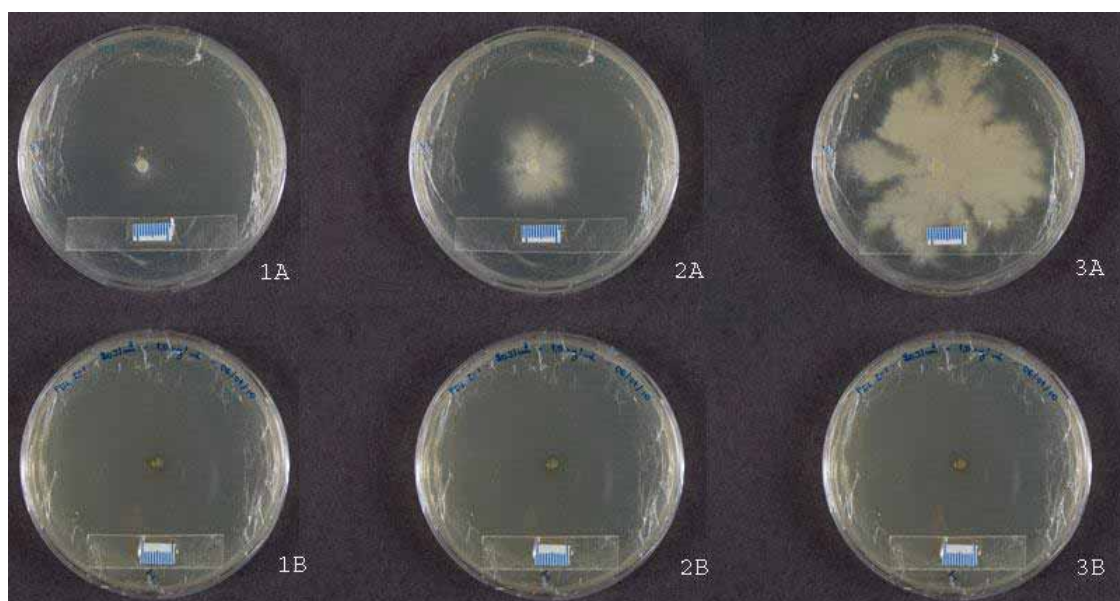


Figura 3-4. Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) com as que receberam tratamento com 30J/cm² e clorina na concentração de 1,3mg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente.

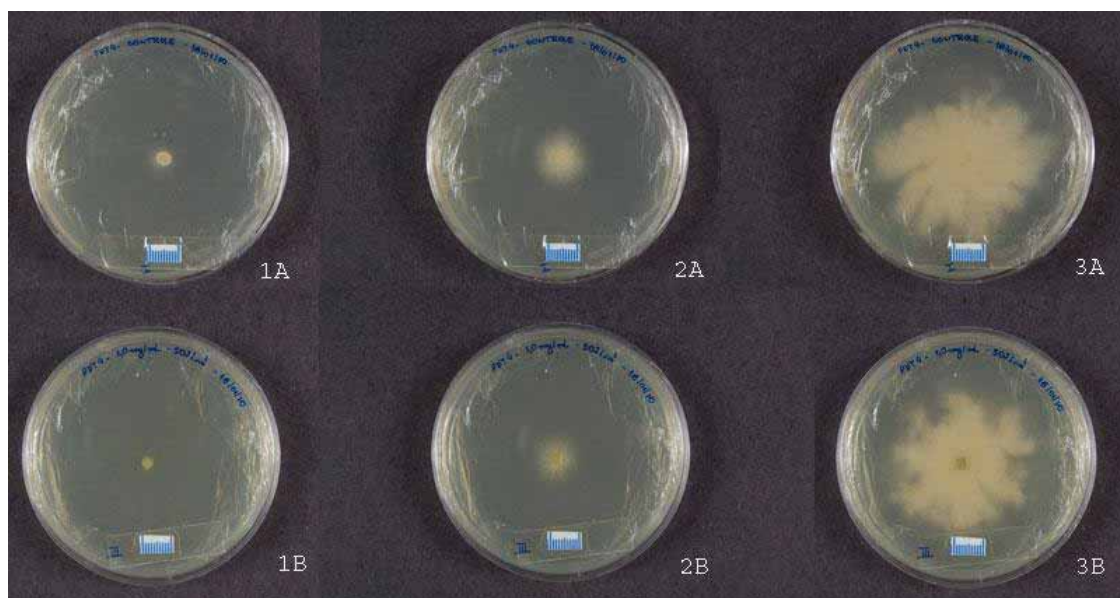


Figura 3-5. Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) com as que receberam tratamento com 50J/cm² e clorina na concentração de 1,0mg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente.

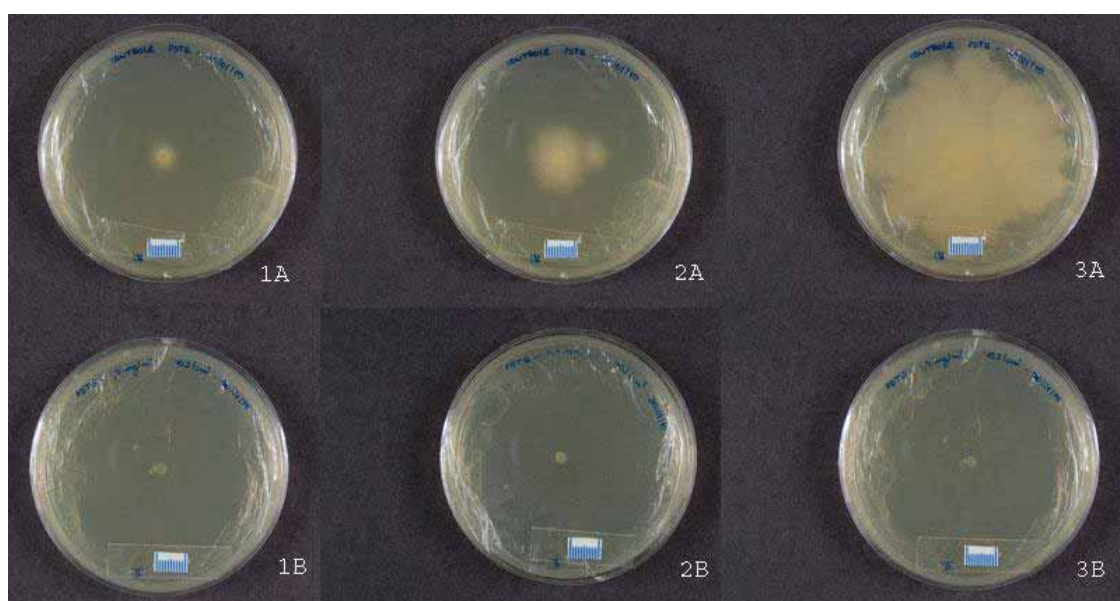


Figura 3-6. Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) com as que receberam tratamento com 70J/cm² e clorina na concentração de 1,0mg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente.

Tabela 3-8. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 1 (30J/cm²) e colônia-mãe de 48h.

Momento	Clorina	N	Média	Desvio Padrão	p-valor K-W
0h	Controle	5	4.48	0.32	0.002
	0,7	5	4.42	0.34	
	1,0	5	4.01	0.20	
	Controle	5	5.30	0.22	
	1,3	5	4.92	0.29	
	Total	25	4.63	0.52	
24h	Controle	5	10.64	3.12	0.001
	0,7	5	4.93	0.92	
	1,0	5	4.09	0.32	
	Controle	5	10.24	2.85	
	1,3	5	4.92	0.29	
	Total	25	6.96	3.42	
48h	Controle	5	27.94	3.85	0.003
	0,7	5	11.77	7.70	
	1,0	5	12.75	10.37	
	Controle	5	24.12	1.24	
	1,3	5	4.92	0.29	
	Total	25	16.30	10.27	
168h	Controle	5	72.74	2.88	0.007
	0,7	5	43.04	35.49	
	1,0	5	36.22	25.24	
	Controle	5	63.93	8.28	
	1,3	5	4.92	0.29	
	Total	25	44.17	30.24	

Tabela 3-9. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-8.

Momento	Comparações Student-Newman-Keuls	p-valor
0h	Controle - 30J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.699
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.150
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.302
24h	Controle - 30J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.013
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	<0.001
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.086
48h	Controle - 30J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.004
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.020
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.013
168h	Controle - 30J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.026
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.007
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.043

No momento 0h é esperado que não haja variação significativa da variação de diâmetro, pois estas medidas refletem a padronização dos fragmentos.

A partir dos resultados expostos nas Tabelas 3-8 e 3-9 é possível comprovar que todos os tratamentos exerceram efeito inibitório no crescimento do patógeno, uma vez que em todas as análises houve diferença significativa da variação do diâmetro da colônia do grupo controle em relação aos tratamentos.

Tabela 3-10. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 2 (50J/cm²) e colônia-mãe de 48h.

Momento	Clorina	N	Média	Desv. Pad	p-valor K-W
0h	Controle	5	4.82	0.22	0.006
	0,7	5	4.30	0.11	
	1,0	5	4.48	0.22	
	1,3	5	4.42	0.23	
	Total	20	4.51	0.27	
24h	Controle	5	8.82	1.14	0.009
	0,7	5	6.58	1.52	
	1,0	5	5.33	1.36	
	1,3	5	5.97	1.71	
	Total	20	6.67	1.89	
48h	Controle	5	17.60	0.83	0.023
	0,7	5	12.08	4.46	
	1,0	5	13.14	1.70	
	1,3	5	14.87	2.13	
	Total	20	14.42	3.24	
168h	Controle	5	60.91	5.27	0.001
	0,7	5	51.84	2.79	
	1,0	5	48.53	3.43	
	1,3	5	57.85	5.31	
	Total	20	54.78	6.39	

Tabela 3-11. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-10.

Momento	Comparações Student-Newman-Keuls	Diferença de Médias	p-valor
0h	Controle - 50J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	-,520200*	.003
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	-,337800*	.046
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	-,404000*	.016
24h	Controle - 50J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	-2.239	.066
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	-3,492000*	.004
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	-2,847000*	.018
48h	Controle - 50J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	-5,52040*	.012
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	-4,45860*	.043
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	-2.722	.277
168h	Controle - 50J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	-9,067800*	.012
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	-12,37820*	.001
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	-3.056	.561

A partir dos resultados expostos nas Tabelas 3-10 e 3-11 é possível comprovar que os tratamentos utilizando dose energética de $50\text{J}/\text{cm}^2$ e concentrações de porfirina de 0,7 e $1,0\text{mg}/\text{mL}$ apresentaram em todos os momentos variação significativa de diâmetro em relação ao controle. A combinação de $50\text{J}/\text{cm}^2$ com $1,3\text{mg}/\text{mL}$ apresentou no início variação estatística, entretanto nos momentos 48 e 168h essa diferença deixou de existir. Provavelmente durante a Terapia Fotodinâmica alguma hifa permaneceu viável, e por isso, ao passar do tempo retomou o crescimento.

Tabela 3-12. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 3 ($70\text{J}/\text{cm}^2$) e colônia-mãe de 48h.

Momento	Clorina	N	Média	Desv. Pad	p-valor K-W
0h	Controle	5	4.78	0.45	0.200
	0,7	5	4.30	0.16	
	1,0	5	4.31	0.21	
	1,3	5	4.31	0.17	
	Total	20	4.43	0.33	
24h	Controle	5	8.85	0.96	0.008
	0,7	5	4.60	0.78	
	1,0	5	5.02	0.95	
	1,3	5	4.31	0.17	
	Total	20	5.69	2.02	
48h	Controle	5	22.83	1.32	0.010
	0,7	5	8.01	5.31	
	1,0	5	10.99	5.81	
	1,3	5	11.93	1.72	
	Total	20	13.44	6.87	
168h	Controle	5	72.16	0.90	0.007
	0,7	5	27.87	24.90	
	1,0	5	44.17	23.34	
	1,3	5	52.05	4.58	
	Total	20	49.07	22.74	

Tabela 3-13. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-12.

Momento	Comparações Student-Newman-Keuls	p-valor
0h	Controle - 70J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.003
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.042
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.003
24h	Controle - 70J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.002
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.019
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.012
48h	Controle - 70J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.001
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.019
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.019
168h	Controle - 70J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.003
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.042
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.003

A partir dos resultados apresentados nas Tabelas 3-12 e 3-13, é possível afirmar que todos os testes realizados empregando-se 70J/cm² para todas as concentrações de clorina apresentaram variação significativa sobre a inibição do crescimento em relação ao grupo controle.

Tabela 3-14. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 4 (30J/cm²) e colônia-mãe de 5 dias.

Momento	Clorina	N	Média	Desvio Padrão	p-valor Anova	p-valor K-W
0h	Controle	5	5.09	0.35	0.133	-
	0,7	5	4.67	0.37		
	1,0	5	4.80	0.11		
	1,3	5	4.80	0.18		
	Total	20	4.84	0.30		
24h	Controle	5	9.76	1.23	<0,001	-
	0,7	5	7.26	0.54		
	1,0	5	6.39	0.90		
	1,3	5	5.71	0.96		
	Total	20	7.28	1.79		
48h	Controle	5	20.27	5.65	0.068	-
	0,7	5	21.75	4.13		
	1,0	5	17.23	3.03		
	1,3	5	13.68	5.49		
	Total	20	18.23	5.35		
168h	Controle	5	63.52	3.14	-	0.003
	0,7	5	68.82	3.16		
	1,0	5	60.79	3.35		
	1,3	5	51.19	14.57		
	Total	20	61.08	9.71		

Tabela 3-15. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-14.

Momento	Comparações Student-Newman-Keuls	Diferença de Médias	p-valor
24h	Controle - 30J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL		
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL		
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL		
168h	Controle - 30J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	-2,49300*	.002
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	-3,36180*	<0,001
	Controle - 30J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	-4,04960*	<0,001

A partir dos resultados expostos nas Tabelas 3-14 e 3-15, é possível afirmar que os tratamentos exerceram efeito inibitório sobre o crescimento do patógeno. No momento

48h a análise estatística revelou uma tendência, entretanto na análise dos momentos anterior (24h) e posterior (168h) houve significância estatística sobre a inibição do crescimento do patógeno.

Tabela 3-16. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 5 (50J/cm²) e colônia-mãe de 5 dias.

Momento	Clorina	N	Média	Desvio Padrão	p-valor K-W
0h	Controle	5	5.22	0.27	0.011
	0,7	5	4.29	0.15	
	1,0	5	4.36	0.21	
	1,3	5	4.37	0.06	
	Total	20	4.56	0.43	
24h	Controle	5	13.00	2.08	0.011
	0,7	5	4.29	0.15	
	1,0	5	4.91	1.41	
	1,3	5	4.37	0.06	
	Total	20	6.64	3.95	
48h	Controle	5	30.55	2.36	0.006
	0,7	5	12.02	7.20	
	1,0	5	12.35	5.25	
	1,3	5	17.23	1.70	
	Total	20	18.04	8.83	
168h	Controle	5	62.99	11.13	0.025
	0,7	5	63.11	2.41	
	1,0	5	48.81	9.00	
	1,3	5	49.03	12.66	
	Total	20	55.98	11.43	

Tabela 3-17. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-16.

Momento	Comparações Student-Newman-Keuls	p-valor
0h	Controle - 50J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.003
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.011
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.014
24h	Controle - 50J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.003
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.011
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.014
48h	Controle - 50J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.004
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.001
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.054
168h	Controle - 50J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0.708
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0.037
	Controle - 50J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0.069

A análise dos resultados expostos nas Tabelas 3-16 e 3-17 corroboram com os resultados expostos nas Tabelas 3-10 e 3-11, nas quais houve significativa inibição do crescimento em relação ao grupo controle nos primeiros momentos (24 e 48h), o que não é observado no momento 168h. Esse fato pode ser devido a algum fragmento de hifa do patógeno que permaneceu viável após o tratamento.

Tabela 3-18. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para PDT 6 (70J/cm²) e colônia-mãe de 5 dias.

Momento	Clorina	N	Média	Desvio Padrão	p-valor K-W
0h	Controle	5	4.73	0.38	0.003
	0,7	5	4.32	0.31	
	1,0	5	4.04	0.20	
	1,3	5	4.04	0.14	
	Total	20	4.28	0.38	
24h	Controle	5	6.99	0.66	0.009
	0,7	5	4.88	1.00	
	1,0	5	4.32	0.66	
	1,3	5	4.04	0.14	
	Total	20	5.06	1.34	
48h	Controle	5	16.91	0.79	0.013
	0,7	5	12.31	3.72	
	1,0	5	11.78	1.38	
	1,3	5	11.19	1.46	
	Total	20	13.05	3.05	
168h	Controle	5	61.22	1.67	0.010
	0,7	5	48.88	6.60	
	1,0	5	43.22	12.68	
	1,3	5	47.66	4.34	
	Total	20	50.25	9.72	

Tabela 3-19. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-18.

Momento	Comparações Student-Newman-Keuls	p-valor
0h	Controle - 70J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0,128
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0,005
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0,004
24h	Controle - 70J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0,051
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0,007
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0,002
48h	Controle - 70J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0,033
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0,006
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0,003
168h	Controle - 70J/cm ² e Clorina 0,7mg/mL	0,022
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,0mg/mL	0,002
	Controle - 70J/cm ² e Clorina 1,3mg/mL	0,008

Como observado nos outros grupos, o tratamento PDT 6 apresentou significância estatística em todos os grupos analisados.

2.4 - Avaliação do efeito da Anfotericina B sobre o crescimento *in vitro* do isolado de *Pythium insidiosum*

Observou-se que a Anfotericina, mesmo na maior concentração 100µg/mL não exerceu efeito inibitório no crescimento do patógeno, como pode ser observado na Figura 3-7 e Tabelas 3-20, 3-21 e 3-22.

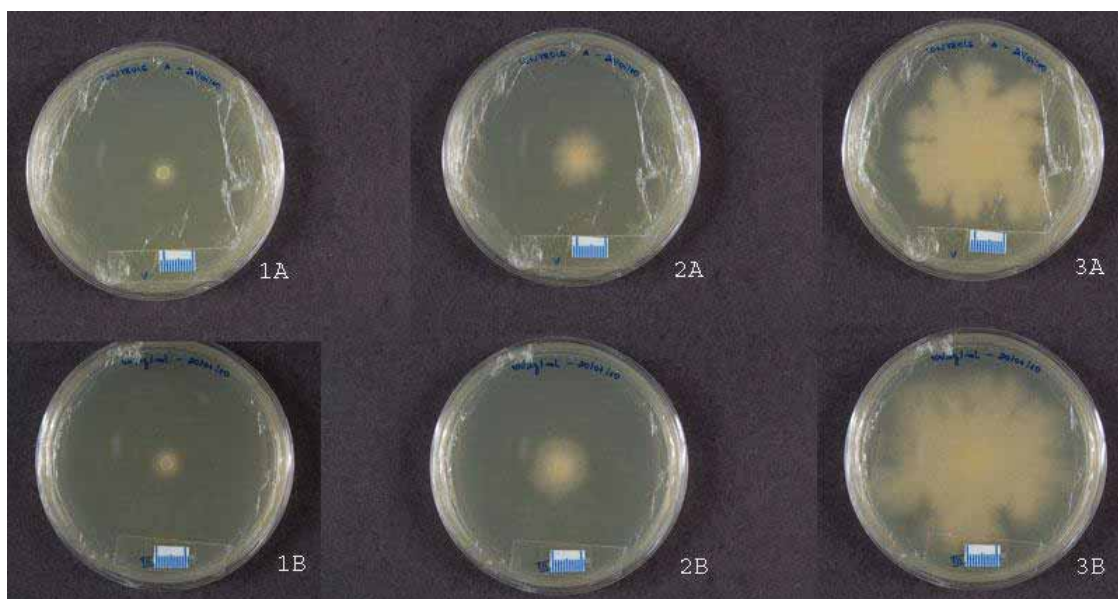


Figura 3-7. Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* B01 do grupo controle (A) com as que receberam Anfotericina B na concentração de 100µg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente.

Tabela 3-20. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para Anfotericina B e colônia-mãe de 48h.

Anfotericina					
Momento	B	N	Média	Desvio Padrão	p-valor Anova
0h	Controle	5	4.97	0.31	0.852
	25	5	4.85	0.30	
	50	5	4.98	0.18	
	100	5	4.96	0.22	
	Total	20	4.94	0.24	
24h	Controle	5	9.01	0.55	0.694
	30	5	9.19	0.72	
	50	5	9.39	0.35	
	70	5	9.28	0.35	
	Total	20	9.22	0.49	
48h	Controle	5	19.01	0.88	0.500
	30	5	19.31	1.88	
	50	5	19.75	1.02	
	70	5	20.13	0.72	
	Total	20	19.55	1.20	
168h	Controle	5	58.13	4.71	0.013
	30	5	63.16	2.91	
	50	5	55.84	1.28	
	70	5	62.02	3.75	
	Total	20	59.79	4.35	

Tabela 3-21. Comparações múltiplas entre os níveis com a finalidade de detectar os pares com diferença de diâmetro significativa indicado em vermelho na Tabela 3-20.

Momento	Comparações Student-Newman-Keuls	Diferença de Médias	p-valor
0h	Controle - Anfotericina 25µg/mL	5.02	0.082
	Controle - Anfotericina 50µg/mL	-2.29	0.592
	Controle - Anfotericina 100µg/mL	3.89	0.209
24h	Controle - Anfotericina 25µg/mL	5.02	0.082
	Controle - Anfotericina 50µg/mL	-2.29	0.592
	Controle - Anfotericina 100µg/mL	3.89	0.209
48h	Controle - Anfotericina 25µg/mL	5.02	0.082
	Controle - Anfotericina 50µg/mL	-2.29	0.592
	Controle - Anfotericina 100µg/mL	3.89	0.209
168h	Controle - Anfotericina 25µg/mL	5.02	0.082
	Controle - Anfotericina 50µg/mL	-2.29	0.592
	Controle - Anfotericina 100µg/mL	3.89	0.209

Tabela 3-22. Análise estatística das medidas de diâmetro obtidas para Anfotericina B e colônia-mãe de 5 dias.

Momento	Anfotericina		Média	Desvio Padrão	p-valor Anova	p-valor K-W
	B	N				
0h	Controle	5	3.98	0.16	-	0.019
	30	5	4.49	0.21		
	50	5	4.56	0.26		
	70	5	4.47	0.45		
	Total	20	4.37	0.36		
24h	Controle	5	7.63	0.54	0.596	-
	30	5	7.17	0.43		
	50	5	7.69	1.04		
	70	5	7.79	0.85		
	Total	20	7.57	0.73		
48h	Controle	5	16.79	0.70	-	0.430
	30	5	17.24	1.21		
	50	5	17.22	2.85		
	70	5	16.22	0.98		
	Total	20	16.87	1.58		
168h	Controle	5	66.70	4.55	0.279	-
	30	5	65.60	3.36		
	50	5	66.24	5.25		
	70	5	70.38	2.52		
	Total	20	67.23	4.19		

2.5 - Taxa de Inibição do crescimento do *P. insidiosum* para os tratamentos de Terapia Fotodinâmica e Anfotericina B

As análises dos resultados dos diferentes grupos da PDT permitem afirmar que houve significativa redução na taxa de crescimento, as quais são expressas em termos de porcentagens na Tabela 3-23. O mesmo não pode ser afirmado em relação ao tratamento convencional com a Anfotericina B, uma vez que a taxa de inibição do crescimento foi insatisfatória, como pode ser apreciado na Tabela 3-24.

Tabela 3-23. Taxa de Inibição para as primeiras 24h para cada tratamento realizado utilizando o isolado B01.

Tratamento	Concentração clorina (mg/mL)	Dose energética (J/cm ²)	Idade colônia-mãe	Taxa de Inibição (%)
PDT1	0,7	30	48h	91,88
	1,0			98,70
	1,3			100,00
PDT2	0,7	50	48h	43,00
	1,0			79,00
	1,3			61,00
PDT3	0,7	70	48h	92,61
	1,0			82,51
	1,3			100,00
PDT4	0,7	30	5 dias	44,43
	1,0			65,67
	1,3			80,69
PDT5	0,7	50	5 dias	100,00
	1,0			92,93
	1,3			100,00
PDT6	0,7	70	5 dias	75,66
	1,0			87,61
	1,3			100,00

Tabela 3-24. Taxa de Inibição do tratamento convencional (Anfotericina B), utilizando o isolado B01.

Tratamento	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Idade colônia- mãe	Taxa de Inibição (%)
Anfotericina B	25	48h	-7,69
	50		-9,43
	100		-7,20
Anfotericina B	25	5 dias	26,10
	50		14,29
	100		8,79

3 - Discussão

Nos testes para o isolado B01 foram utilizadas colônias-mãe com 48 horas e com 5 dias, a fim de verificar a eficácia da Terapia Fotodinâmica frente a uma cultura mais velha, e assim com maior número de hifas. Entretanto, ao realizar os testes observou-se que apesar de visivelmente apresentar uma maior espessura devido ao maior número de hifas, os fragmentos padronizados das colônias-mãe com 5 dias apresentaram menor viabilidade, o que dificultou o trabalho *in vitro*.

A partir das figuras e tabelas é possível notar a eficácia da Terapia Fotodinâmica principalmente nas primeiras 48 horas. Estes resultados confirmaram a suspeita de que após a terapia fotodinâmica alguma hifa permaneceu viável e assim, com o passar do tempo a colônia retomou seu crescimento. Este fato sugere a realização da terapia fotodinâmica fracionada, ou seja, com mais de uma exposição. Entretanto, mesmo com a retomada do crescimento em alguns casos, depois de um período de tempo, o efeito fotodinâmico é muito superior ao tratamento convencional realizado com Anfotericina B.

- discutir tamanho de equipamento: dose energética uniforme
- tempo de pré-irradiação: maior que cinco horas
- dificuldade de se obter uma metodologia para avaliação do crescimento do patógeno

Capítulo 4 – Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas

4.1 - Discussão

A pitiose é considerada uma doença emergente, que afeta animais e humanos principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (MENDOZA et al., 1996). Seu agente etiológico, *Pythium insidiosum*, por se tratar de um falso-fungo, pertence ao Reino Stramenopila, filo Oomycota. Caracteristicamente os fungos verdadeiros, ou seja, os pertencentes ao Reino Fungi, apresentam algumas características diferenciadas, como por exemplo, a presença de quitina e glucanas em sua parede celular e a presença de ergosterol na membrana plasmática (ALEXOPOULOS et al., 1994). O ergosterol é o principal sítio de ação das drogas antifúngicas, quer seja por inibição de sua síntese ou mesmo pela ligação da droga antifúngica à molécula de ergosterol. Tanto um mecanismo quanto o outro promovem a desestruturação da membrana plasmática, levando à morte a célula fúngica (SEBATELLI et al., 2006).

P. insidiosum, assim como os demais oomicetos apresenta parede celular composta principalmente de β -glucanas (β -1,3 e β -1,6), assim como aminoácido hidroxiprolina e pequenas quantidades de celulose. Duas características principais que também separam os fungos dos oomicetos diz respeito à síntese do aminoácido lisina e da síntese de esteróis, sendo esta última característica fundamental nos aspectos terapêuticos. O metabolismo dos esteróis nos oomicetos é significativamente diferente dos fungos verdadeiros, o que os separa em dois grandes grupos: os que são capazes de sintetizar esteróis a partir do mevalunato e os que não são capazes de sintetizar os esteróis (GRIFFITH et al., 1992). Os organismos deste último grupo são espécies fitopatogênicas pertencentes à

ordem *Peronosporales*, a qual se insere o *Pythium insidiosum*. De acordo com Köller (1992), é aceito que o ergosterol está ausente no filo Oomycota.

A Anfotericina B, por exemplo, é uma droga antifúngica reservada para o tratamento de algumas infecções fúngicas severas. Seu mecanismo de ação é se ligar à molécula do ergosterol, presente na membrana plasmática dos fungos verdadeiros, criando poros na membrana. Apesar de não ser indicada para o tratamento da pitiose, observam-se alguns trabalhos relatando resultados variados em sua administração, tanto pela via oral, tópica, quanto da combinação das duas. No entanto, apesar destes resultados variados quanto a utilização da Anfotericina B, todos os trabalhos mencionam a remoção cirúrgica da lesão como principal forma de tratamento (MACMULLAN, 1977; MARQUES et al., 2006). Apesar de eficaz, o procedimento cirúrgico é limitado pela localização da lesão, extensão, e acometimento de estruturas anatômicas adjacentes, bem como pelo estado geral do animal.

Em 1997, Sedrish (1997), relatou sucesso no tratamento da pitiose utilizando, após a remoção cirúrgica da lesão, raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio.

A Terapia Fotodinâmica apresenta fatores favoráveis para o tratamento de infecções de diferentes etiologias, tanto infecções bacterianas, virais, por protozoários, como também causadas por fungos (JORI; BROWN, 2004). Os fatores favoráveis mencionados incluem a grande área de atuação, sendo que o mesmo fotossensibilizador pode ser utilizado para diversos micro-organismos; a eficácia independe da linhagem do micro-organismo ou de sua resistência às drogas convencionais; protocolos de tratamento que permitem uma grande redução populacional do patógeno com pouco dano ao tecido adjacente; possibilidade de realizar tratamentos com repetições sem induzir o micro-organismo a adquirir resistência, além de se tratar de um procedimento local e não invasivo (JORI et al., 2006).

Na literatura, a grande parte dos trabalhos com inativação fotodinâmica de fungos envolvem espécies resistentes de *Candida*, e relatam sucesso nos tratamentos. (BLISS, 2004; CALVAZARA-PINTON et al., 2004; CALVAZARA-PINTON et al., 2005).

Diante das características da PDT, acrescentadas da efetividade do tratamento com as espécies resistentes de *Candida*, motivou-se a analisar este efeito no *Pythium insidiosum*, uma vez que todos os tratamentos disponíveis atualmente não são totalmente eficazes, dependendo de diversos fatores.

Como este trabalho trata-se de um teste piloto, foi necessário avaliar todos os parâmetros para que fosse possível o efeito inibitório de crescimento, como dose energética, concentração de fotossensibilizador e período de pré-irradiação. Os parâmetros aqui apresentados tanto para porfirina quanto para clorina, representam os melhores resultados obtidos durante a experimentação.

A PDT diminuiu significativamente o crescimento *in vitro* do patógeno em todas as combinações de luz+fotossensibilizador utilizados. 72% das colônias apresentaram taxa de inibição maior que 80%, sendo que destes, mais de 55% apresentaram taxa de inibição entre 90 e 100%. Esses dados, de uma única aplicação, sugerem que a PDT fracionada (com repetição) pode vir a ser um método ainda mais eficaz, podendo atingir completa inviabilização do crescimento do patógeno.

Segundo Rodrigues e Luvizotto (2000), a imunoterapia apresenta em torno de 50% de sucesso quando associada à remoção cirúrgica com grande margem de segurança. Essa porcentagem pode sofrer sensível redução caso não seja possível a remoção completa do tecido (RODRIGUES; LUVIZOTTO, 2000). Outro tratamento associado à remoção cirúrgica é a administração da Anfotericina B. Além do seu alto custo, esta droga apresenta sérios efeitos colaterais como hepato e nefrotoxicidade e anemia (CHAFFIN et al., 1995).

Existe ainda a administração oral de iodeto de sódio, bem como de potássio, associado também à remoção cirúrgica. Os resultados apresentam sucesso variável (ZAMOS et al., 1996).

Diferentemente das abordagens terapêuticas existentes, o resultado do efeito fotodinâmico independe do tamanho da lesão ou de regiões adjacentes, além de não apresentar efeitos colaterais tóxicos.

Ao comparar os resultados obtidos com a Terapia Fotodinâmica com os tratamentos convencionais existentes, a inibição e/ou redução significativa do crescimento do patógeno *in vitro*, revela que esta técnica pode vir a ser um tratamento promissor contra a pitiose.

4.2 - Conclusões finais

- Foi estabelecida uma metodologia prática para manipulação do patógeno em ensaios *in vitro*, com possibilidade de análise qualitativa e quantitativa;
- A terapia fotodinâmica comparada ao tratamento convencional mostrou-se elevadamente mais eficaz, principalmente para a dose energética de $70\text{J}/\text{cm}^2$ e utilizando como fotossensibilizador a clorina (0,7, 1,0 e 1,3mg/mL);
- Apesar de preliminares, e até então pioneiros em se tratando desta abordagem para o *P. insidiosum*, estes resultados mostram-se promissores e representam uma ferramenta eficaz no tratamento de lesões cutâneas e subcutâneas de pitiose, uma vez que mostrou seu papel fungicida e fungistático, além de ter a vantagem de não induzir a seleção natural do patógeno.

4.3 – Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS C.J., MIMS C.W., BLACKWELL, M. Introductory Mycology. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., Chap. 23: **Phylum Oomycota**, p. 683-737, 1996.

ALLISON, N., GILLIS, J. P. Enteric phytiosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association.**, v.196, p.462 – 4, 1990.

ARNING, M.; SCHARF, R. E. Prevention of amphotericin B-induced nephrotoxicity by loading with sodium chloride: a report of 1291 days of treatment with amphotericin B without renal failure. *Klin Wochenschr* v.67, p. 1020-1028, 1989.

BADENOCH, P.R., COSTER, D.J., WETHERALL, B.L., BRETTIG, H.T., ROZENBILDS, M.A., DRENT, A. *Pythium insidiosum* keratitis confirmed by DNA sequence analysis. **Br. J. Ophthalmol.**, v.85, p.502-3, 2001.

BLISS, J. M., BIGELOW, C. E., FOSTER, T. H., HAIDARIS, C. G. Susceptibility of Candida Species to Photodynamic Effects of Photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2000-2006, Vol. 48, No. 6, 2004;

BOEHNCKE, W.H., ELSHORST-SCHMIDT, T., KAUFMANN, R. Systemic photodynamic therapy is a safe and effective treatment for psoriasis, **Arch Dermatol.**, v.136, p.271–2, 2000.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, p. 19-33, 1995.

BOSCO, S. M. G., BAGAGLI, E., ARAÚJO JR, J. P., 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(5), p. 715-718, 2005.

CALZAVARA-PINTON, P. G., VENTURINI, M., SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **J.**

Photochem Photobiol, v. 78, p. 1-6, 2005.

CALZAVARA-PINTON, P. G., VENTURINI, M., CAPEZZERA, R., SALA, R., ZANE, C. Photodynamic Therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid.

Photodermatol Photoimmunol Photomed, v. 20, p. 144-147, 2004.

CARVALHO, E.C.Q., LEMOS, L.S., REIS, JR.J.L. Pitiose equina: o popular formigueiro da Baixada Campista. **Bol Téc URNF.**, p.1: 48, 2000.

CARVALHO, E.C.Q., ROSA, C.A.R., CRUZ, C.H. Hyphomyces destruens: agente da “ferida brava” (hifomicose) em equinos do pantanal do Mato Grosso. In PROCEEDINGS OF CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1984, Belém. **Sociedade dos Médicos Veterinários do Pará**, p.311, 1984.

CHAFFIN, M. K., SCHUMACHER, J., HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. **J. Amer. Veter. Med. Assoc.**, v. 201, n. 2, p. 310-312, 1992.

CHOUDARY, S., NOURI, K., ELSAIE, M. Photodynamic therapy in dermatology: a review. **Lasers Med Sci.**, 2009.

DE COCK, A.W., MENDOZA, L., PADHYE, A.A., AJELLO, L., KAUFMAN L. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. **J Clin Microbiol.**, v.25, p.344-9, 1987.

GRIFFITH, J. M., DAVIS, A. J., GRANT, B.. 1992. Target Sites of Fungicides to Control *Oomycota*. Pp. 69-100. In: *Target Sites of Fungicide Action*. Eds. W. Köller. CRC, Boca Raton, FL.

GUEDES, R.M.C., ZICA, K.G.B., NOGUEIRA, R.H.G. Ficomicose e habronemose cutânea. Estudo retrospectivo de casos diagnosticados no período de 1979 a 1996. **Arq Bras Med Vet Zootec.**, v.50, p.465-8, 1998.

HENDERSON, B. W.; BUSCH, T. M.; SNYDER, J. W. Fluence Rate as a Modular of PDT Mechanisms. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.38, p.489-493, 2006.

HEADLEY, A.S., ARRUDA, H.N., JR. Equine cutaneous pythiosis: a report of four cases. **Ciência Rural**, v.34, p.289-92, 2004.

IMWIDITHAYA P. Human pythiosis in Thailand. **Med J.**, v.70, p.558-60, 1994.

JORI, G., FABRIS, C., SONCIN, M., FERRO, S., COPPELLOTTI, O., DEI, D., FANTETTI, L., KATO, H.; History of Photodynamic Therapy – Past, Present Future. **Gan Kagaku Ryoho**, v. 23(1), p.8-15, 1996.

JHONSON, E. M. WARNOCK, T. W.; LUCKER, J.; POSTER S. R.; SCULLY, C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy of oral candidiasis. **J. Antimicrob. Chemotherapy**. v. 35, p.

JORI, G.; BROWN, S.B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, p.403-405, 2004.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.38, p.466-481, 2006.

KAUFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**, v.143, p.3-7, 1998.

KÖLLER, W. Antifungal Agents with Target Sites in Sterol Functions and Biosynthesis. Pp. 119-206. In: *Target Sites of Fungicide Action*. Ed. W. Köller. CRC, Boca Raton, FL.

KRAJAEJUN, T., KUMAKORN, M., PRACHAKTAM, R., CHONGTRAKOOL, P., SATHAPATAYAVONGS, B., CHAIPRASERT, A. Identification of a novel 74-kilodalton

immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. **J Clin Microbiol.**, v.44(5), p.1674-80., 2006a.

KRAJAEJUN, T., SATHAPATAYAVONGS, B., PRACHARKTAM, R., NITIYANANTI, P., LEELACHAIKUL, P., WANACHIWANAWIN, P. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clin Infect Dis.**, v.43(5), p.569-76, 2006b.

LARSON, C.E., MENG, M.C., NAHAS, C.R., MICHALANY, N.S., NEWTON, J., ROSA, P.S. Pitiose canina - Aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1997, Gramado.

LEAL, A.B.M., LEAL, A.T., SANTURIO, J.M., KOMMERS, G.D., CATTO, J.B. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típico e atípicos. **Pesq. Vet. Bras.**, 2001.

LEVY, J.G., Photodynamic Therapy. **Trends in Biotechnol.**, v.13, p.14, 1995.

LLANOS, A.; CIEZA, J.; BERNARDO, J.; ECHEVARRIA, J.; BIAGGIONI, I.; SABRA, R.; BRANCH, R. A. Effect of salt supplementation on amphotericin B nephrotoxicity. *Kidney Int* v. 40, p. 302-308, 1991.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MANDELL, G.L.; PETRI, W. A. Jr. Antimicrobial Agents. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. ed. Goodman and Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, New York, US: 1996; 1165-8.

MARQUES, S.A., BAGAGLI, E., BOSCO, S.M.G., CAMARGO, R.M.P., MARQUES, M.E.A. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v.81(5), p.483 – 485, 2006.

- 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.
- MENDOZA, L., AJELLO, L., MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J Mycol Med.**, v.6(4), p.151-64, 1996.
- MENDOZA, L., HERNANDEZ, F., AJELLO, L. Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Clin. Microbiol.**, v.31(11), p.2967-73, 1993.
- MENDOZA, L., VILLALOBOS, J., CALLEJA, C.E. Evaluation of two vaccines for treatment of pythiosis insidiosi in horses. **Mycopathology.**, v.119, p.89-95, 1992.
- MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Aust Vet J.**, v.57, p.377-82, 1981.
- MILLER, R.I., CAMPBELL, R.S.F. Immunological studies on equine phycomycosis. **Aust Vet J.**, v.58, p.227-31, 1982.
- OCHSNER, M., Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 39, p. 1-18, 1997.
- PASS, H. I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 85, n. 6, p. 443-456, 1993.
- PATEL, R. Antifungal Agents – Part I – Amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo Clin Proc* v.73, p. 1205-1225, 1998.
- PRASERTWITAYAKIJ N, LOUTHRENOO W, KASITANON N, THAMPRASERT K, VANITTANAKOM N. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. **Semin Arthritis Rheum.**, v.33, p.204-14, 2003.

- RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A.; DA SILVA, A. R.; FLORES, A. V.; RONCHI, L. M.; TEDESCO, A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Elc. Quim.** v.32(1), p.7-14, 2007.
- RECH, R.R., GRAÇA, D.L., BARROS, C.S.L. Pitiose em um cão: relato de caso e diagnósticos diferenciais. **Clínica Veterinária.**, v.50, p.68-72, 2004.
- RESHENTNICKOV, A. V.; PONOMAREV, G. V.; ABAKUMOVA, O. Y.; TSVETKOVA, T. A.; KARMENYAN, A. V.; REBEKO, A. G.; BAUM, R. P. Novel drug form of chlorine e₆. In: OPTICAL METHODS FOR TUMOR TREATMENT AND DETECTION: MECHANISMS AND TECHNIQUES IN PHOTODYNAMIC THERAPY, 9. **Proceeding of SPIE.** v. 3909, p. 124-130, 2000.
- RIET-CORRÊA, F., FERREIRA, J.L.M., SCHILD, A.L. Pitiose em cão. **Bolletín do Laboratório Regional de Diagnóstico UFPEL.** Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 1998, p.55.
- RODRIGUES, C. A., LUVIZOTTO, M. C. R. Zigomicose e pitiose cutânea em equinos: diagnóstico e tratamento. **Continuous Education Journal**, v. 3, n. 3, p. 03-11, 2000.
- SANTOS, M.N., LONDERO, A. T. Zigomicose cutânea em cavalos. **Pesq Agrop Bras S Vet.**, v.9, p.57-61, 1974.
- SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., PEREIRA, D.B., ARGENTA, J. S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae.**, v.34(1), p.1-14, 2006.
- SANTURIO, J.M., MONTEIRO, A.B., LEAL, A.T., KOMMERS, G.D., DE SOUSA, R.N., CATTO J.B. Cutaneous Pythiosis insidiosi in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycophatologia.**, v.141, p.123-25, 1998.
- SAWAYA, B. P.; BRIGGS, J. P.; SCHNERMANN, J. Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties. **J. Am. Soc Nephrol** v.6, p.154-164, 1995.

SATHAPATAYAVONGS, B., LEELACHAIKUL, P., PRACHAKTAM, R., ATICHARTAKARN, V., SRIPHOJANART, S., TRAIRATVORAKUL, P. Human pythiosis associated with Thalassaemia Hemoglobinopathy Syndrome. **J Infect Dis.**, v.159, p.274-80, 1989.

SEDRISH, S.A., MOORE, R.M., VALDES-VASQUES, M.A. Adjunctive use of a neodymium: yttrium-aluminum garnet laser for treatment of pythiosis granulomas in two horses. **J Am Vet Med Assoc.**, v.211(4), p.464-5, 1997.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova.** v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

STAR, W.M., MARIJNISSEN, J.P.A., VAN GEMERT, M.J.C. **J.Photochem.Photobiol.**, p.149, 1987.

TABOSA, I.M., RIET-CORREA, F., NOBRE, V.T.M., AZEVEDO, E.O., REIS-JUNIOR, J.L., MEDEIROS, R.M.T. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Vet Pathol.**, v.41, p.412-5, 2004.

STERNBERG, E. D., DOLPHIN, D., BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, p. 4151-4202, 1998.

THIANPRASIT, M., CHAIPRASERT, A., IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis. **Curr Topics Med Mycol.**, v.7, p.43-54, 1996.

TOLINS, J. P.; RAIJ, L. Chronic amphotericin B nephrotoxicity in the rat, protective effect of prophylactic salt loading. *Am J Kidney Dis* v.11, p. 313-317, 1988.

TRISCOTT, J. A., WEEDON D., CABANA E. Human subcutaneous pythiosis. **J Cutan Pathol.**, v.20, p.267-271, 1993.

VANDENBERGH, H. Light and porphyrins in cancer therapy. **Chemistry in Britain**, v. 22, n. 5, p. 430-434, 1986.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob Chemother.** v.42, p.13-28, 1998.

WILSON, B. C., PATTERSON, M. S. *Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease*, Ed. D. Kessel (CRC Press, Boca Raton, 1990), v.1, p.129-144.

ZAMOS, D. T., SCHUMACHER, J., LOY, J. K. Nasopharyngeal conidiobolomycosis in a horse. **J. Amer. Veter. Med. Assoc.**, v. 208, n. 1, p. 100-101, 1996.

ZHU, T., FINLAY, J. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Med. Phys.**, v.35(7), 2008.

ZHU, T. C., FINLAY, J. C., ZHOU, X., LI, J. "Macroscopic modeling of the singlet oxygen production during PDT", Proc. SPIE, 2007.