

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**TRATAMENTO DA PITIOSE EM MEMBROS DE
EQUINOS POR MEIO DE PERFUSÃO REGIONAL
INTRAVENOSA COM ANFOTERICINA B**

Renata Gebara Sampaio Dória
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**TRATAMENTO DA PITIOSE EM MEMBROS DE
EQUINOS POR MEIO DE PERFUSÃO REGIONAL
INTRAVENOSA COM ANFOTERICINA B**

Renata Gebara Sampaio Dória

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária (Cirurgia Veterinária).

Jaboticabal – SP
Março - 2009

D696t Dória, Renata Gebara Sampaio
Tratamento da pitiose em membros de equinos por meio de perfusão regional intravenosa com anfotericina B / Renata Gebara Sampaio Dória. – – Jaboticabal, 2009
xiii, 98 f.: il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Carlos Augusto Araújo Valadão
Banca examinadora: Antônio Carlos Alessi, José Wanderley Cattelan, Juliana Regina Peiró, Rita de Cássia Campbell
Bibliografia

1. Anfotericina B 2. Perfusão regional intravenosa 3. Pitiose equina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617:636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENATA GEBARA SAMPAIO DÓRIA – nasceu em Jaboticabal/SP, em 11 de janeiro de 1980, filha de Álvaro de Abreu Sampaio Dória Filho e de Eliamar Gebara Sampaio Dória. Em 1998, ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, no curso de graduação em Medicina Veterinária. No período de 1998 a 2001, participou do Programa Especial de Treinamento – PET e, no período de 2001 a 2002, foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. Graduiu-se Médica Veterinária em dezembro de 2002. No período de 2003 a 2005, participou do Programa de Aprimoramento Profissional, no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, na área de Cirurgia e Anestesiologia de Grandes Animais. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, em março de 2005 e obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária em outubro de 2006. Trabalha, desde junho de 2006, como Professora e Médica Veterinária da Universidade de Cuiabá (UNIC/Cuiabá – MT). Em março de 2007, deu continuidade ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Câmpus de Jaboticabal e obteve o título de Doutor em Cirurgia Veterinária em março de 2009.

“A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída. Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”

A.J. Cronin

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, por permitir meu ingresso no universo da pesquisa e acreditar no meu potencial.

Aos Professores Antonio Carlos Alessi, José Corrêa de Lacerda Neto, José Wanderley Cattelan, Juliana Regina Peiró, Rita de Cássia Campbell e Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, pela disposição, presença e sugestões feitas na banca de qualificação e defesa de tese de doutorado, certamente com o objetivo de enriquecer o trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, pela oportunidade e apoio à realização de pesquisas científicas.

À Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Câmpus de Jaboticabal e a todos os professores que honram esta Instituição, por serem alicerce sólido, formadores de bons pesquisadores e descobridores.

À nossa equipe de pesquisa: Silvio Henrique de Freitas, Renato Fernandes Souza e Alcides Martins Filho pela realização de um experimento criterioso, associado à extrema responsabilidade e espírito de pesquisa.

À Família Martins pelo empenho, apoio, dedicação e, acima de tudo, pensamentos positivos, os quais nos estimularam a trabalhar, mesmo nas horas mais quentes dos dias.

À Professora Laura Peixoto de Arruda, pela importante colaboração para que o projeto de pesquisa, na fase de exames histopatológicos e imuno-histoquímica, pudesse ser desenvolvido de maneira criteriosa e sem dificuldades.

Aos meus pais, avós e ao meu tio José Jorge Gebara (tio Zé), pelo apoio e amor incondicional.

Ao Silvio, pelo imenso apoio, esforço, compreensão e companheirismo diário.

À Universidade de Cuiabá (UNIC), Faculdade de Medicina Veterinária e Hospital Veterinário da UNIC, por fomentar este projeto de pesquisa.

À Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Laboratório de Patologia Veterinária, pela colaboração com a realização do método de imuno-histoquímica.

Ao Professor Jânio Santúrio e Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) por terem produzido e cedido os anticorpos anti-*Pythium insidiosum* para realização do método de imuno-histoquímica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) que acreditou e auxiliou no desenvolvimento deste estudo experimental.

À Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos que apoiou este estudo experimental, fornecendo a anfotericina B.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
III. OBJETIVOS.....	23
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Grupos de Tratamentos.....	24
4.3 Avaliação Clínica.....	25
4.4 Procedimento Experimental.....	25
4.4.1 Primeira Etapa.....	25
4.4.2 Segunda Etapa.....	28
4.5 Avaliação Histopatológica.....	29
4.6 Técnica de Imuno-Histoquímica.....	30
4.7 Avaliação das Feridas.....	32
4.7.1 Classificação Macroscópica das Feridas.....	32
4.7.2 Intervalo entre as Avaliações.....	33
4.8 Análise dos Dados.....	33
V. RESULTADOS.....	34
5.1 Animais.....	34
5.2 Avaliação Clínica.....	36
5.3 Avaliação Histopatológica.....	36
5.4 Técnica de Imuno-Histoquímica.....	39
5.5 Avaliação das Feridas.....	40
5.5.1 Tempo de Evolução, Dimensão (cm ²) e Localização Anatômica da Lesão.....	40
5.5.2 Macroscopia da Lesão.....	41

5.5.3 Avaliação do Aparelho Locomotor.....	45
5.6 Observações Complementares.....	46
5.6.1 Avaliação da Técnica de Perfusão Regional com Anfotericina B no Tratamento de Pitiose em Membro de Equinos.....	46
5.6.2 Avaliação do Tempo de Garroteamento com Torniquete.....	47
5.6.3 Avaliação da Dose de Anfotericina B.....	47
VI. DISCUSSÃO.....	49
VII. CONCLUSÕES.....	60
VIII. REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.....	87

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1.** Valores referentes ao número e porcentagem (%) de equinos que apresentavam feridas grandes ($> 25 \text{ cm}^2$) e feridas pequenas ($< 25 \text{ cm}^2$), submetidos à técnica de perfusão regional intravenosa do membro com anfotericina B (Ganf) e de equinos do grupo controle (Gc)..... 40
- Tabela 2.** Discriminação da localização anatômica, tempo de evolução e dimensões da ferida (cm) na primeira avaliação (D0) dos equinos submetidos à técnica de perfusão regional intravenosa do membro com anfotericina B (Ganf) e nos equinos do grupo controle (Gc). São apresentados os animais que necessitaram de reaplicação do fármaco no 14º dia (D14)..... 41
- Tabela 3.** Valores referentes ao número e porcentagem (%) de equinos, conforme escala pré-estabelecida, que apresentavam claudicação ao passo, nos dias 0, 7, 14 e 21 pós-operatórios, dos animais tratados com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional do membro (Ganf) e controles (Gc)..... 46
- Tabela 4.** Valores referentes ao número e porcentagem (%) de equinos, com feridas grandes ($> 25 \text{ cm}^2$) e pequenas ($< 25 \text{ cm}^2$), que necessitaram de administração única ou uma administração e, após 14 dias, uma reaplicação de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional do membro (Ganf)..... 47

LISTA FIGURAS

Página

- Figura 1.** Ilustração de excisão cirúrgica do tecido de granulação exuberante e dos “kunkers”, evitando exposição óssea ou penetração articular (A) e hemostasia por termocauterização (B)..... 26
- Figura 2.** Ilustração da técnica de perfusão regional do membro em equinos do grupo tratado com anfotericina B. Notar em A e B, administrações manuais da solução de anfotericina B, com auxílio de seringa de 60 mL e extensor de cateter (escalpe 21). Observar posicionamento dos cateteres intravenosos (setas vermelhas), nas veias safena (em A) e digital palmar comum (em B), localizados proximais às feridas e distais aos torniquetes de borracha..... 28
- Figura 3.** Ilustração do progresso da condição corporal de equinos do grupo tratado com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf), entre a primeira (D0) e a última (D60) avaliação. Notar em A, C e E (D0) animais com condições corporais entre 2 e 3 (muito magros e magros) e, em B, D e F (D60) animais com condições corporais 5 (moderados)..... 35
- Figura 4.** Fotomicrografias mostrando tecido de granulação e “kunkers” das feridas de pitiose nos membros dos equinos. Notar em A, área eosinofílica necrótica extensa - “kunkers” (K) e infiltrado inflamatório (setas amarelas) difuso e intenso (HE, objetiva 10x). Notar em B, infiltrado inflamatório (seta amarela) e imagens negativas de “pseudo-hifas” (seta preta) na área de necrose (HE, objetiva 40x) e, em C e D, imagens negativas de “pseudo-hifas” (seta preta) na área de necrose (HE, objetiva 40x)..... 37

- Figura 5.** Fotomicrografias mostrando tecido de granulação e “kunkers” das feridas de pitiose nos membros dos equinos. Em A observam-se “pseudo-hifas”, coradas em preto ou marrom-escuro (GMS, objetiva 10x). Notar em B (GMS, objetiva 10x) e C (GMS, objetiva 40x) a localização das “pseudo-hifas” na periferia dos “kunkers” (setas pretas) e, em C e D (GMS, objetiva 40x), a tendência das “pseudo-hifas” em formar ângulos retos (setas brancas), com características morfológicas de *Pythium insidiosum*..... 38
- Figura 6.** Fotomicrografia mostrando tecido de granulação e “kunkers” extraídos das feridas de pitiose nos membros dos equinos, corados pelo método da imuno-histoquímica para *Pythium insidiosum*. Notar imunomarcagem positiva (LSAB) para *Pythium insidiosum* (setas brancas) em A (objetiva 4x), B (objetiva 10x), C e D (objetiva 40x)..... 39
- Figura 7.** Ilustração da evolução da cicatrização de feridas de pitiose de equinos tratados com aplicação única de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf), no primeiro dia (D0) e nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 60 do período pós-operatório (D7, D14, D21, D28, D35 e D60). Notar ferida tipo 1 em A, ferida tipo 2 em B, ferida tipo 3 em C e D, ferida tipo 4 em E e ferida tipo 5 em F e G (seta vermelha – linha de epitelização; seta azul – tecido epitelizado). Em H observa-se redução do aumento de volume, do membro torácico esquerdo, após cicatrização da ferida (círculo vermelho)..... 43
- Figura 8.** Ilustração da evolução da cicatrização de feridas de pitiose de equinos tratados com duas aplicações de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf), no primeiro dia (D0) e nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 60 do período pós-operatório (D7, D14, D21, D28, D35 e D60). Notar ferida tipo 1 em A, ferida tipo 2 em B,

ferida tipo 3 em C, D, E e F, ferida tipo 4 em G e ferida tipo 5 em H (seta vermelha – linha de epitelização; seta azul – tecido epitelizado). Observar em C, a presença de área vermelha-escura na ferida (seta preta), caracterizando a necessidade de reaplicação do fármaco..... 44

Figura 9. Ilustração da evolução da cicatrização (setas azuis) de feridas de pitiose de equinos tratados com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf), na primeira avaliação (D0) e no último dia (D60) do período pós-operatório..... 48

TRATAMENTO DA PITIOSE EM MEMBROS DE EQUINOS POR MEIO DE PERFUSÃO REGIONAL INTRAVENOSA COM ANFOTERICINA B

RESUMO – Avaliaram-se os efeitos da perfusão regional intravenosa com anfotericina B, um antimicótico, em membros de equinos acometidos por pitiose, combinada com a excisão cirúrgica. Foram utilizados 16 equinos, jovens e adultos, da raça pantaneira, com pitiose em membro torácico ou pélvico, distalmente às articulações do cotovelo ou joelho, distribuídos em dois grupos experimentais. Um constituído de 12 equinos tratados, após excisão cirúrgica e termocauterização, por perfusão regional intravenosa do membro com anfotericina B (Ganf) e outro constituído de quatro equinos não tratados (controle, Gc). As feridas foram fotografadas e avaliadas antes do início do tratamento (D0) e após sete (D7), catorze (D14), vinte e um (D21), vinte e oito (D28), trinta e cinco (D35) e sessenta (D60) dias e foi realizado exame do aparelho locomotor. No Ganf, 92% dos animais apresentaram cicatrização das feridas de pitiose e no Gc 100% apresentaram recrudescência da afecção. No Ganf, 58% exigiram administração única de anfotericina B pela técnica de perfusão regional do membro e 42% exigiram uma readministração, após 14 dias. No Ganf, 33% apresentaram ulceração no local da administração da anfotericina B e 42% apresentaram aumento de volume do membro e dor à palpação na região perfundida pela anfotericina B. No Ganf, 100% dos animais apresentavam claudicação severa no D0 e 92% não apresentavam claudicação no D21. Conclui-se que a administração de anfotericina B, por perfusão regional intravenosa, promove a cura da pitiose, com mínimas reações adversas, sendo uma alternativa terapêutica para o tratamento de pitiose em membros de equinos.

Palavras-Chave: anfotericina B, equinos, perfusão regional intravenosa, pitiose

PYTHIOSIS TREATMENT IN EQUINE LIMBS BY INTRAVENOUS REGIONAL PERFUSION WITH AMPHOTERICIN B

SUMMARY – The effects of intravenous regional perfusion with amphotericin B, an antifungal drug, in equine limbs with pythiosis associated with surgical excision were evaluated. 16 horses, young and adults, pantaneira breed, with pythiosis in thoracic or pelvic limbs, distally to the elbow or knee joints, were allocated into two experimental groups. One constituted by 12 horses treated, after surgical excision and thermocauterization, by intravenous regional limb perfusion with amphotericin B (Ganf) and other constituted by four not treated horses (control, Gc). The wounds were photographed and evaluated before the beginning of the treatment (D0) and after seven (D7), fourteen (D14), twenty-one (D21), twenty-eight (D28), thirty-five (D35) and sixty (D60) days and examination of the locomotor system was performed. 92% of the animals with pythiosis presented wound healing in Ganf and, in Gc, 100% presented recrudescence of the disease. In the Ganf, 58% of the animals needed single administration of amphotericin B by regional limb perfusion and 42% of the animals needed one more administration after 14 days. In the Ganf, 33% of the animals presented ulceration in the amphotericin B injection site and 42% of the animals presented limb edema and pain during palpation of the amphotericin B perfused region. In Ganf, 100% of the animals presented severe lameness at D0 and 92% of the animals presented no lameness at D21. It can be concluded that the administration of amphotericin B by intravenous regional perfusion promotes pythiosis remission with minimal side effects, being a therapeutic alternative to the pythiosis treatment in equine limbs.

Keywords – amphotericin B, equine, intravenous regional perfusion, pythiosis

1. INTRODUÇÃO

A zigomicose constitui um conjunto de afecções micóticas de estreita semelhança anatomopatológica, que acomete a pele e o tecido subcutâneo, o trato digestório e o respiratório, especialmente de equinos (RODRIGUES & LUVIZOTTO, 2000; BIAVA et al., 2007). Constitui um grupo complexo de doenças piogranulomatosas que inclui a pitiose, a conidiobolomicose e a basidiobolomicose causadas pelo *Pythium insidiosum*, *Conidiobolus coronatus* e *Basidiobolus haptosporus* (*Basidiobolus ranarum*), respectivamente (MENDOZA et al., 1996; BIAVA et al., 2007). A pitiose é uma doença cutânea, gastrintestinal ou multissistêmica, granulomatosa, que atinge equinos, caninos, bovinos, ovinos, felinos e humanos e ocorre em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas (MEIRELES et al., 1993; FOIL, 1996; MENDOZA, et al., 1996; SANTURIO et al., 1998; LEAL et al., 2001b), causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* (De COCK et al., 1987). Este organismo filamentoso encontra-se em ambientes aquáticos, especialmente em regiões pantanosas, com temperaturas superiores a 25º C, como o Pantanal Mato-Grossense (LEAL et al., 2001a). Em equinos, a enfermidade caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos, com a presença de massas necróticas denominadas “kunkers” (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES et al., 1993). A pitiose é considerada uma doença emergente (VANITTANAKOM et al., 2004) e, apenas recentemente, foi descrita no Brasil em humanos (BOSCO et al., 2005) e em ovinos (TABOSA et al., 2004). Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose no Brasil baseia-se nos dados clínico-epidemiológicos, confirmados pelo exame histopatológico e/ou micológico. O diagnóstico é relativamente fácil em casos crônicos, porém, lesões cutâneas iniciais ou sistêmicas são de difícil detecção pelos métodos tradicionais e

influenciam, decisivamente, no sucesso do tratamento (LEAL et al., 2001b). O exame histopatológico é auxiliar no diagnóstico e necessita de outras provas para confirmação, como a imuno-histoquímica (BROWN et al., 1988). A pitiose causa prejuízos significativos na criação de equinos no Brasil, seja pela morte dos animais, pela perda de função ou pelos gastos com tratamentos (LEAL et al., 2001a). Vários métodos terapêuticos têm sido utilizados, principalmente em equinos, incluindo tratamento medicamentoso (antimicóticos), cirúrgico e imunoterápico (SANTURIO et al., 2004). Existe dificuldade no tratamento devido às características deste oomiceto, que não apresenta esteróis de membrana, sendo, portanto, resistente à maioria dos antimicóticos (FOIL, 1996). Ademais, a falta de diagnóstico agrava o quadro e faz com que a doença seja uma ameaça à vida dos equinos (SANTURIO et al., 2004).

A perfusão regional é uma técnica que consiste na infusão de uma substância em uma região do organismo isolada vascularmente da circulação sistêmica (MARTÍNEZ, 2004). Surgiu com BIER e colaboradores, em 1908, e consiste na aplicação regionalizada de um fármaco ou medicamento restringindo-se, temporariamente, a sua absorção sistêmica. As primeiras aplicações clínicas da perfusão regional em animais datam da década de 60, inicialmente, com o objetivo de conseguir anestésias regionais das áreas distais das extremidades (ANTALOVSKY, 1965; AVE-MANN, 1974; PRENTICE et al., 1974) e, posteriormente, para o tratamento de infecções localizadas (FINSTERBUSCH et al., 1970; FESSL & AWAD-MASALMEH, 1975; HAUCK-BAUER, 1977). A administração conjunta de um anestésico local e de um antibiótico, em uma mesma perfusão regional, permite, ao mesmo tempo, a administração de um antibiótico para o tratamento da infecção e a realização de um debridamento cirúrgico dos tecidos afetados, sem anestesia geral (HAUCK-BAUER, 1977; STANEK et al., 1984).

As primeiras aplicações de antibióticos por perfusão regional em animais foram descritas em coelhos, em 1970 (FINSTERBUSCH et al., 1970). A partir de 1975 apareceram estudos na espécie bovina (FESSL & AWAD-MASALMEH, 1975; DIETZ et al., 1980; STANEK et al., 1984). Em 1990, DIETZ & KEHNSCHERPER descreveram pela primeira vez, nos equinos, a técnica de perfusão regional do membro com

antibióticos. Com base nestas experiências desenvolvidas majoritariamente na Alemanha e, devido ao crescente interesse por desenvolver novas formas de veiculação local ou regional de antibióticos, que permitam melhorar a efetividade do tratamento das infecções ortopédicas em cavalos, numerosos investigadores, em nível mundial, tem desenvolvido trabalhos, frutos dos quais, atualmente, a perfusão regional do membro é considerada uma técnica efetiva para o tratamento de processos infecciosos das extremidades dos animais (WHITEHAIR et al., 1992a; MURPHEY et al., 1994; SANTACHI et al., 1998; CRUZ, 1999; MURPHEY et al., 1999).

Com a perfusão regional, o antibiótico alcança os tecidos, mediante difusão, a partir do compartimento ou leito vascular próximo. Durante a perfusão regional, se produz uma dilatação dos capilares, das vênulas pós-capilares e dos vasos linfáticos, o que origina o relaxamento dos contatos entre as células endoteliais e os pericitos, com uma maior difusão, sem produzir danos celulares (LANGER et al., 1996). As altas concentrações de antibiótico no sistema vascular e a pressurização do mesmo geram um gradiente de concentração muito elevado entre o espaço intravascular e os tecidos, o que maximiza o processo de difusão a todos estes (líquido sinovial, tecidos moles e osso), incluindo os pouco vascularizados, onde os patógenos se encontram protegidos (FINSTERBUSCH & WEINBERG, 1972).

Dessa forma, com a finalidade de oferecer aos médicos veterinários conhecimentos complementares que permitam uma alternativa aos tratamentos atuais para pitiose nos membros de equinos, se objetivou, com este estudo, avaliar a técnica de perfusão regional intravenosa do membro com anfotericina B, um antimicótico, para o tratamento de infecções por pitiose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O gênero *Pythium* pertence ao filo Oomycota, cujos membros se caracterizam pela produção de zoosporos biflagelados (reprodução assexuada), reprodução sexuada oogâmica, parede celular composta de β -glucanos, celulose e hidroxipolina, talo diplóide, mitocôndria com crista tubular e características moleculares e bioquímicas próprias, destacando-se uma rota alternativa para a síntese de lisina (ALEXOPOULOS et al., 1996; MOORE-LANDECKER, 1996), particularidades que os diferenciam dos fungos verdadeiros. Esse gênero possui mais de 120 espécies, sendo a maioria habitante do solo e engloba, também, o patógeno de plantas, responsável pela doença “tombamento das mudas” (“damping-off”), que causa prejuízos na agricultura. Entretanto, o *Pythium insidiosum* é a única espécie, do gênero, que além de plantas, pode infectar mamíferos, incluindo o homem (ALEXOPOULOS et al., 1996; MOORE-LANDECKER, 1996; GROOTERS & GEE, 2002).

A pitiose em equinos é uma doença ulcerativa, proliferativa e granulomatosa que envolve a pele e o tecido subcutâneo, causada pelo *Pythium insidiosum*, um oomiceto aquático zoospórico, do reino Stramenopila, filo Oomycota, família Pythiaceae, encontrado, principalmente, em regiões pantanosas, com temperaturas médias superiores a 25°C (DE COCK et al., 1987; MEIRELES et al., 1993; MENDONZA et al., 1996; LEAL et al., 2001b; SALLIS et al., 2003; SANTURIO et al., 2006a).

O agente habita água estagnada infectando plantas aquáticas. Reproduz-se de forma sexuada, por esporangiósporos móveis, liberados dos esporângios, que se aderem em plantas aquáticas e/ou restos vegetais em decomposição. Nos animais, a instalação desse oomiceto ocorre, principalmente, em soluções de continuidade na pele (MILLER, 1983; MENDOZA et al., 1993; BIAVA et al., 2007).

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, tendo sido relatada nas Américas, alguns países europeus, sudeste asiático, Oceania e, recentemente, na África (CHAFFIN et al. 1995; FOIL, 1996; MENDOZA et al., 1996). Provavelmente, o Pantanal brasileiro seja o local de maior ocorrência e prevalência de pitiose equina no mundo, constituindo-se planície inundável de, aproximadamente, 140.000 km², com população estimada em 140.000 equinos, sendo a pitiose um problema frequente para a criação de equinos (SILVA et al, 1995; MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006a).

As condições ambientais favoráveis, determinantes para a produção de zoósporos, são temperatura entre 30 e 40° C e acúmulo de água estagnada, já que a maioria dos casos de infecção por pitiose ocorre durante ou após a estação chuvosa, entre os meses de fevereiro e maio (verão-outono), período máximo das cheias do Pantanal (MILLER & CAMPBELL, 1982; LEAL et al., 2001a; LEAL et al., 2001b; SANTURIO et al., 2006a). Há relatos de 38 casos de pitiose em equinos, na Paraíba, a maioria ocorrendo nos meses de julho a outubro, sete a dez meses após o início das chuvas, sugerindo a existência de um período de incubação de várias semanas (TABOSA et al., 1999; SANTURIO et al., 2004).

Não há predisposição por sexo, idade ou raça, sendo determinante para a infecção os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e homens (MENDONZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006a).

Em 1983, MILLER propôs um ciclo biológico para descrever o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa desse oomiceto zoospórico. O ciclo começa com a colonização em plantas aquáticas, substrato para o desenvolvimento e reprodução desse microorganismo, originando os zoosporângios. Os zoósporos livres na água, movimentam-se até encontrar outra planta (ou animal), onde se ancoram e emitem o tubo germinativo, para a formação de um novo micélio, completando o ciclo. Análises *in vitro* sugeriram uma quimiotaxia dos zoósporos por pelos e tecidos animais e vegetais, atribuída ao tropismo por substâncias presentes nesses tecidos. Após aderência e encistamento do zoósporo no hospedeiro, uma substância amorfa, possivelmente uma glicoproteína, é liberada, provavelmente, em resposta ao fator quimiotático do próprio

hospedeiro, a qual atuaria como um adesivo para fixar o zoósporo, permitindo a formação do tubo germinativo (MENDOZA et al., 1993). Uma vez aderidos ou fixados, o oomiceto produz filamentos em forma de hifas que, com a secreção de enzimas proteolíticas, penetram nos tecidos superficiais adjacentes, promovendo a afecção denominada pitiose. A infecção no homem e em animais é casual e não tem importância na manutenção do agente no ambiente. Há somente o crescimento vegetativo das hifas, sem produção das formas propagativas infectantes.

Assim, os equinos em contato com águas contaminadas poderiam atrair os zoósporos, os quais germinariam a partir de uma pequena lesão cutânea (MILLER, 1983; MENDOZA et al., 1993). Há, também, a possibilidade de penetração dos zoósporos pelos folículos pilosos, pois foram detectadas hifas no interior de folículos de bovinos infectados naturalmente, sugerindo existir quimiotaxia ativa no pelo dentro do folículo (SANTÚRIO et al., 1998). Entretanto, hifas, esporos encistados (resting spores) e oogônias de *Pythium insidiosum* tem sido associados com a transmissão da pitiose (MENDOZA et al., 1996). Sendo assim, exsudato de material contaminado pode ser considerado como uma fonte de infecção zoonótica (CHAFFIN et al., 1995). Isto indica que o potencial zoonótico exato desta afecção ainda precisa ser elucidado (HEADLEY et al., 2002).

No Brasil, a pitiose já foi descrita em equinos, bovinos, ovinos, caninos e no homem, sendo alta a prevalência do oomiceto em lesões cutâneas em equinos (TABOSA et al., 2004; MARQUES et al., 2006; SANTURIO et al., 2006a). O primeiro relato, em equinos, ocorreu no Rio Grande do Sul, por SANTOS & LONDERO (1974). A partir desse momento, os relatos de pitiose no país, somam em estados como o Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Paraíba e Pernambuco (CARVALHO et al., 1984; SANTOS et al., 1987; MEIRELES et al., 1993; TÚRY & COROA, 1997; TABOSA et al., 1999; LEAL et al., 2001a,b; HEADLEY et al., 2002; LUVIZARI et al., 2002; REIS JR & NOGUEIRA, 2002; SALLIS et al., 2003; HEADLEY & ARRUDA, 2004; FREY JR et al., 2007). Além disso, há os casos suspeitos, relatos informais e comunicações em

congressos feitas por médicos veterinários, indicando a presença da doença em vários estados brasileiros.

A doença em equinos é conhecida por outros nomes como hifomicose, zigomicose, dermatite granular, “bursattee”, “Florida leeches”, granuloma ficomicótico e “swamp cancer”. Nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, o nome popular mais conhecido é “ferida da moda” (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996; LEAL et al., 2001a; SANTURIO et al., 2006a). O termo hifomicose inclui outras doenças causadas por fungos, especialmente *Conidiobolus ranarum* e *Basidiobolus haptosporum*, além de membros da ordem Mucorales (BROWN & ROBERTS, 1988).

Os animais com pitiose no aparelho locomotor apresentam claudicação, prurido, dor, apatia, inapetência, perda de peso e hipoproteïnemia. O prurido e a dor levam os animais à auto-mutilação, mediante mordidas e choques contra objetos rígidos (MEIRELES et al., 1993; CHAFFIN et al., 1995; MENDONZA et al., 1996; LEAL et al., 2001a). Os proprietários dos animais, normalmente, procuram tratamento quando as feridas já apresentam caráter crônico, relatando que o surgimento foi repentino e com crescimento rápido das lesões (FREY JR et al., 2007).

As lesões cutâneas são as mais frequentes e atingem, principalmente, as extremidades distais dos membros e a porção ventral da parede toracoabdominal, provavelmente, devido ao contato com águas contaminadas com zoósporos (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996). As feridas são inicialmente pequenas e com aspecto inofensivo, de forma circular, podendo aumentar sobre uma área que estava apenas tumefacta, de maneira ulcerativa. Em função da proliferação tecidual exacerbada para os tecidos circunvizinhos, a afecção pode se disseminar até mesmo para os vasos linfáticos e linfonodos regionais, podendo, em alguns casos, chegar até a cavidade abdominal (KNOTTEBELT & PASCOE, 1998; LUVIZARI et al., 2002). Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando grandes massas teciduais, com bordas irregulares, de aparência tumoral, com hifas recobertas por células necróticas que formam massas brancoamareladas, semelhantes a corais, chamadas, internacionalmente, de “kunkers”. Os “kunkers” variam de 2 a 10 mm de diâmetro, tem forma irregular, ramificada, com aspecto arenoso e penetram no tecido

granular, dentro de seios formados ao longo do seu trajeto. O tamanho das lesões depende do local e duração da infecção e apresentam secreção serossanguinolenta, mucossanguinolenta, hemorrágica e, às vezes, muco-purulenta e fétida, que drenam dos tecidos granulomatosos e necróticos, em forma de colméias. A lesão piogranulomatosa alastra-se rapidamente pelos tecidos, associada à formação de tecido de granulação e hemorragias. Essa perda sanguínea pode ser suficiente para causar anemia nos animais acometidos (KNOTTEMBELT & PASCOE, 1998; LUVIZARI et al., 2002). Na maioria dos casos, cada animal apresenta foco único da lesão, porém, lesões cutâneas multifocais já foram relatadas (MILLER & CAMPBELL, 1982; CHAFFIN et al., 1992).

A pitiose intestinal é a segunda forma mais freqüente da infecção em equinos. Os casos descritos cursaram com episódios de cólica, causadas pela presença de massas teciduais, levando à redução e/ou obstrução do lúmen intestinal. Os achados de necropsia e excisão cirúrgica revelam ulceração intestinal e massas nodulares de até 20 cm de diâmetro na parede do jejuno. Os achados histopatológicos variam de tecido conjuntivo fibroso com áreas de necrose de coagulação e focos de mineralização (sem infiltrado eosinofílico) à granuloma eosinofílico crônico, porém, sem a observação de “kunkers” (ALLISON & GILLIS, 1990; MORTON et al., 1991; PURCELL et al., 1994).

Outros tecidos também podem ser atingidos secundariamente às lesões cutâneas (REIS JR et al., 2003), incluindo lesões ósseas adjacentes à lesão primária. As lesões ósseas caracterizam-se por exostoses, osteólises e osteomielite no exame radiológico e presença de granulomas eosinofílicos, com áreas de necrose e massas necróticas contendo hifas no exame histopatológico (ALFARO & MENDOZA, 1990; EATON, 1993). ALFARO & MENDOZA (1990) citam quatro animais acometidos com pitiose, envolvendo o tecido ósseo, em que houve a necessidade de eutanásia.

Casos de metástase, via linfática, para os pulmões e linfonodos regionais, tais como os linfonodos cervicais inferiores, inguinais e submandibulares, já foram relatados (MURRAY et al., 1978; GOAD, 1984; LEAL et al., 1997). Os linfonodos atingidos apresentavam “kunkers”, dos quais foi possível o isolamento do agente etiológico (MILLER & CAMPBELL, 1984).

Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose baseia-se nos aspectos clínicos, histopatológicos e no isolamento e identificação do agente por meio de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas. O isolamento do *Pythium insidiosum* pode ocorrer mediante o aspecto das colônias e das características das hifas (BROWN et al., 1988; HOWERTH et al., 1989; FISCHER et al., 1994; PURCELL et al., 1994). Este isolamento requer colheita de material adequado e pode ser dificultado por contaminações secundárias da lesão. A correta identificação do *Pythium insidiosum* deve incluir a indução da zoosporogênese, que demanda tempo e pessoal treinado, o que torna, portanto, o diagnóstico precoce difícil de ser realizado (MENDOZA et al., 1987; LEAL et al., 2001b; SANTURIO et al., 2006b; PEREIRA et al., 2008).

Histologicamente, a pitiose caracteriza-se por inflamação granulomatosa e granulocítica. Nos equinos, os “kunkers” apresentam-se como áreas de necrose eosinofílica, de tamanho variado, forma circular e com contornos irregulares, compostas por hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, especialmente eosinófilos. Em torno das hifas, os eosinófilos estão desgranulados e, em direção à periferia, os grânulos tornam-se mais evidentes. Na borda é comum encontrar eosinófilos intactos. A área entre os “kunkers” é caracterizada por inflamação granulomatosa e supurativa, composta por exsudato inflamatório espesso de neutrófilos e eosinófilos (MILLER & CAMPBELL, 1984; BROWN et al., 1988; CHAFFIN et al., 1995; HEADLEY & ARRUDA, 2004).

Em cortes histológicos, corados com métodos histoquímicos a base de prata, podem-se observar hifas com paredes espessas, esparsamente septadas, irregularmente ramificadas (normalmente em ângulo reto) e medindo de 2 a 6 µm de diâmetro (MILLER & CAMPBELL, 1984; CHAFFIN et al., 1995; HEADLEY & ARRUDA, 2004; SANTURIO et al., 2006a). Porém, a identificação precoce da doença torna-se difícil com a utilização desse método (SANTURIO et al., 2004) e requer diferenciação de outras lesões granulomatosas (CHAFFIN et al., 1992; LEAL et al., 2001a). O diagnóstico diferencial inclui, principalmente, a habronemose, e, também, neoplasias, tecido de granulação exuberante e granulomas fúngicos e bacterianos (CHAFFIN et al., 1992).

Atualmente, métodos como a imuno-histoquímica (BROWN et al., 1988), imunodifusão (MILLER & CAMPBELL, 1982; KAUFMAN et al., 1990), ensaio imunoenzimático ELISA (MENDOZA et al., 1997; SANTURIO et al., 2006b) e, mais recentemente, os métodos moleculares (GROOTERS & GEE, 2002; SCHURKO et al., 2004; VANITTANAKOM et al., 2004) auxiliam e suportam o diagnóstico precoce e correto (MENDOZA et al., 1996).

Em 1988, BROWN et al. descreveram pela primeira vez o método de imuno-histoquímica para diagnóstico de pitiose equina, que foi posteriormente utilizado por vários autores (HOWERTH et al., 1989; FISCHER et al., 1994; PURCELL et al., 1994). O teste imuno-histoquímico de coloração, utilizando a técnica de peroxidase indireta, diferencia o *Pythium insidiosum* de outros fungos. Consiste na coloração seletiva das hifas de *Pythium insidiosum* e na ausência de coloração das hifas de fungos dos gêneros *Basidiobolus* e *Conidiobolus*, com base em cortes histológicos do material fixado em formalina (BIAVA et al., 2007). Em 2002, REIS & NOGUEIRA comprovaram que o método de imuno-histoquímica apresenta uma alta especificidade no diagnóstico de infecção pelo *Pythium insidiosum*.

O tratamento de infecções pelo *Pythium insidiosum*, um “pseudo-fungo”, nos animais e no homem é dificultado pelas características da membrana celular desse patógeno. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua membrana, enquanto o *Pythium insidiosum* contém celulose e β -glucanos. O ergosterol é o componente de membrana celular alvo da ação da maioria dos antimicóticos tradicionais, mas como a membrana celular do *Pythium insidiosum* não contém esse esteróide, esses fármacos não são eficazes para combatê-lo (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989; FOIL, 1996).

A pitiose merece destaque pela dificuldade de tratamento e pelo risco que representa para a vida de animais e humanos afetados. Inúmeros tratamentos têm sido utilizados, principalmente em equinos, incluindo o químico (antimicóticos), o cirúrgico e a imunoterapia (CHAFFIN et al., 1992; FOIL, 1996; SANTURIO et al., 2006a). O sucesso do tratamento depende do tamanho, tempo de instalação, local da lesão, idade e estado nutricional do animal, sendo, frequentemente, relatado insucesso ou recidiva (MENDOZA et al., 1997).

O tratamento tradicional da pitiose eqüina é o cirúrgico, realizando-se a excisão de toda a área atingida, associado à administração de medicamentos antimicóticos, embora a recorrência seja comum (30%) em lesões maiores (MILLER, 1981). A ablação do micetoma com laser pode resultar em necrose térmica, podendo matar o agente que estiver infiltrado no tecido adjacente, reduzindo desta forma o risco de recorrência (SEDRISH et al., 1997; BIAVA et al., 2007). SEDRISH et al. (1997) relataram o sucesso do uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio como tratamento suplementar após a remoção cirúrgica de lesões de pitiose equina.

Apesar da taxa de recidiva ser relativamente alta, a excisão cirúrgica é a mais utilizada e a que apresenta os melhores resultados, quando realizada o mais precocemente possível e de forma abrangente. A localização e extensão da lesão e o envolvimento de estruturas adjacentes podem influenciar nos resultados do tratamento cirúrgico, em virtude da dificuldade de remoção de todos os focos infecciosos, principalmente quando estruturas anatômicas dos membros estão envolvidas (SANTURIO et al., 2006a).

A excisão deve contemplar as bordas da pele, ao redor da região ulcerada, que, aparentemente, encontra-se íntegra. Geralmente, ocorrem hemorragias que são contidas por cauterização, ligadura dos vasos ou bandagens compressivas. A cicatrização ocorre por segunda intenção e a recorrência é um achado comum, especialmente quando o tecido comprometido não foi totalmente removido. Entre os tratamentos mais comumente associados à excisão cirúrgica, ressalta-se a administração de anfotericina B (RODRIGUES & LUVIZOTTO, 2000; BIAVA et al., 2007).

Os antimicóticos, aplicados por via sistêmica, muitas vezes não são eficazes no tratamento da pitiose, sendo mais comumente empregados a anfotericina B, o cetoconazol, o miconazol, o fluconazol e o itraconazol. Além desses, usam-se compostos iodínicos, como os iodetos de potássio e de sódio (MCMULLAN et al., 1977; CHAFFIN et al., 1992; LEAL et al., 2001b; SALLIS et al., 2003; SANTURIO et al., 2006a; BIAVA et al., 2007). Segundo estudo de SEKHON et al. (1992), os poliênicos, como a anfotericina B, não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azólicos

(fluconazol, cetoconazol e miconazol) inibiram o crescimento *in vitro* de *Pythium insidiosum*. Em outro teste, os fármacos anfotericina B, flucitosina, miconazol e griseofulvina não inibiram o crescimento do oomiceto, enquanto o itraconazol apresentou atividade moderada e, apenas a terbinafina foi ativa contra o *Pythium insidiosum*. A associação de terbinafina e itraconazol apresentou efeito sinérgico e foi eficaz em infecção facial por *Pythium insidiosum*, no homem (SHENEP et al., 1998). TRISCOTT et al. (1993) descreveram que, no homem, a anfotericina B debelou dois casos de infecção periorbital e HEALTH et al. (2002) obtiveram remissão clínica de um quadro de pitiose pulmonar humana, com a associação de itraconazol e anfotericina B. Porém, devido à nefrotoxicidade desses fármacos, necessitam-se monitorar, constantemente, concentrações séricas de uréia e creatinina. Além disso, a forte irritação causada por estes fármacos antimicóticos pode causar flebite (NOBRE et al., 2002). Segundo GONZÁLES et al. (1979), a extirpação cirúrgica do granuloma mostrou-se eficaz contra as fomicoses subcutâneas, associada ao iodeto de potássio. O tratamento cirúrgico também pode ser associado ao iodeto de sódio para tratar a pitiose cutânea (CHAFFIN et al., 1992).

Atualmente, tem sido proposta a imunoterapia empregando-se culturas de fungo fenolizadas, expostas às ondas ultrassônicas, onde as hifas são maceradas e liofilizadas (MARIELLO & DE BOER, 2000; BIAVA et al., 2007). A imunoterapia pode ser realizada utilizando-se vários antígenos derivados de *Pythium insidiosum*. Esta modalidade terapêutica constitui uma alternativa concreta para o controle da doença e tem apresentado resultados promissores (MILLER, 1981; LEAL et al., 2001b; BIAVA et al., 2007). Porém, o diagnóstico precoce e a intervenção cirúrgica, associado ao tratamento imunoterápico, são fundamentais para a eficácia do tratamento (MENDOZA et al., 1992).

O índice de cura aproxima-se a 100% quando o tratamento imunoterápico é precedido de remoção ou debridamento cirúrgico das lesões, mas, se usada isoladamente, apresenta sucesso de 50%. A aplicação do composto causa reações como inchaço, dor e aumento de temperatura no local das injeções ou formações de abscessos (RODRIGUES & LUVIZOTTO, 2000; BIAVA et al., 2007). Os primeiros sinais

de melhora ocorrem, geralmente, entre 7 a 21 dias após a primeira aplicação, observando-se a redução do prurido, das secreções (exsudatos) e estabilização do tamanho da lesão, sendo os “kunkers” expelidos. A epitelização inicia-se 14 a 21 dias seguintes às injeções iniciais. Por outro lado, as lesões crônicas são mais difíceis de tratar devido à resposta baixa à imunoterapia e, geralmente, possuem infecções secundárias (NEWTON & SCHUMACHER, 1997; BIAVA et al., 2007).

McMULLAN et al. (1977) descreveram que a anfotericina B, em doses entre 0,5 a 1,5 mg/kg de peso, diluída em 1 litro de solução de glicose 5%, para aplicação intravenosa, foi 50% eficaz quando associada à remoção cirúrgica; 30% apenas com a anfotericina B e 20% das fomicoses subcutâneas não responderam aos tratamentos. MALECAZE et al. (1992) recomendaram a anfotericina B tópica no tratamento das queratomicoses, pela penetração rápida no tecido e menor toxicidade, sendo que as soluções de anfotericina B (50 mg) em dimetilsulfóxido (DMSO – 10 mL) aumentam a absorção dérmica (MARIELLO & DE BOER, 2000; THOMASSIAN, 2005; BIAVA et al., 2007).

O prognóstico da pitiose, em equinos, depende do comprometimento de estruturas adjacentes à ferida, como tendões, articulações, fáscias e tecido ósseo. A linfadenopatia regional é frequente, proporcionando a disseminação do agente a regiões distantes como trato gastrointestinal e pulmões (RODRIGUES & LUVIZOTTO, 2000; BIAVA et al., 2007). A evolução é rápida, pois, devido ao prurido, os animais dilaceram a ferida, causando sangramento profuso, levando ao emagrecimento e debilidade orgânica (LEAL et al., 2001a; BIAVA et al., 2007).

Nos últimos anos, estão sendo desenvolvidas novas técnicas de administração local e regional de antibióticos que permitam alcançar altas concentrações de antibiótico no local da infecção, enquanto se mantém as concentrações sistêmicas abaixo do grau de toxicidade do fármaco e permitem o emprego de fármacos cuja administração sistêmica, em cavalos, resultaria economicamente proibitiva (WERNER et al., 2003; MARTÍNEZ, 2004; GILLIAM et al., 2008; ERRICO et al., 2008).

Durante anos, a administração local de agentes antimicrobianos foi considerada um tabu, porque as soluções variavam o pH fisiológico, o que era considerado nocivo

para os tecidos. No entanto, já é comprovado que os efeitos prejudiciais da administração local de antibióticos foram excessivamente exagerados e, esta é considerada um dos avanços mais importantes no manejo das infecções ortopédicas dos cavalos, pois, a administração de antibioticoterapia regional elimina de maneira eficaz as infecções articulares e ósseas (LLOYD et al., 1990; WININGER & FASS, 1996; WERNER et al., 2003; MARTÍNEZ, 2004; ERRICO et al., 2008; GILLIAM et al., 2008).

A administração sistêmica de antimicrobianos se mantém como terapia complementar importante, mas a administração loco-regional permite alcançar concentrações, locais e regionais, muito superiores à administração sistêmica e oferece vantagens como: maior segurança de que o antimicrobiano alcance concentrações terapêuticas no local de infecção; concentrações do antimicrobiano, locais e regionais, superiores à concentração inibitória mínima (CIM), o que reduz o aparecimento de resistência emergente; diminuição ou eliminação do risco de desenvolvimento de efeitos adversos sistêmicos, como a nefrotoxicidade, a ototoxicidade e a neurotoxicidade e custo econômico reduzido, o que possibilita a utilização de fármacos onerosos em animais de grande porte, como os equinos (BERTONE et al., 1990).

Tem-se desenvolvido vários métodos para a administração local ou regional de antibióticos, tais como a administração intra-articular, os implantes de polimetilmetacrilato (PMMA) ou de polímeros biodegradáveis impregnados com antibióticos, as bombas de infusão e a perfusão regional intraóssea e intravenosa (WERNER et al., 2003; MARTÍNEZ, 2004; ERRICO et al., 2008; GILLIAM et al., 2008).

A perfusão regional intravenosa dos membros de equinos é uma técnica de administração de fármacos, por meio da qual se promove difusão local destes aos tecidos, pelo sistema venoso regional, utilizando-se de uma veia superficial. Para a realização desta técnica, um garrote (torniquete) é colocado proximal ao local de infecção (ou lesão) e um antimicrobiano é injetado, sob pressão, no sistema venoso, de forma que a pressão utilizada durante a infusão intravenosa do fármaco resulte em difusão do antibiótico ao tecido afetado (GAGNON et al., 1994; MURPHEY et al., 1994; MURPHEY et al., 1999; BUTT et al., 2001).

O grande determinante para uma resposta clínica à terapia com antimicrobianos é que a concentração inibitória mínima deste fármaco seja atingida no tecido infectado. O efeito bactericida dos antimicrobianos é proporcional ao pico de concentração dos fármacos nos tecidos (MOORE et al., 1987). Dessa forma, os tecidos infeccionados apresentam, normalmente, trombose vascular e isquemia, limitando a entrega dos antibióticos sistêmicos aos tecidos infectados, em concentrações suficientes para efeito bactericida (McILWRAITH, 1983). Já a perfusão regional é uma técnica que produz maiores concentrações de antimicrobianos nas porções distais dos membros quando comparada à administração sistêmica (BUTT et al., 2001).

A perfusão regional tem se tornado uma técnica de escolha por não requerer equipamentos especiais, ser rapidamente realizada e de baixo custo, além de alcançar elevadas concentrações de antibióticos nos tecidos infectados, pobremente perfundidos, na extremidade distal dos membros de equinos (PALMER & HOGAN, 1999; BUTT et al., 2001). Algumas limitações têm sido encontradas nesta técnica nas situações clínicas. O edema acentuado, devido à celulite ou trauma aumenta a dificuldade na identificação das veias, assim como, cateterizações ou venopunções sucessivas são, frequentemente, dificultadas devido à hemorragia localizada e tromboflebite (BUTT et al., 2001).

Muitos estudos buscam a dose apropriada do fármaco, melhor volume de administração, o intervalo apropriado entre as perfusões e o número de perfusões necessárias para conter condições sépticas nas porções distais dos membros de equinos. Já foi demonstrado que doses inadequadas podem, em excesso, promover necrose de tecidos moles na região perfundida (SANTSCHI et al., 1998). Da mesma forma, não existem dados informando o volume de perfusão ideal para que se alcance a completa difusão do fármaco no tecido afetado. Presumivelmente, o volume a ser infundido deve estar correlacionado com o tamanho do membro (BUTT et al., 2001).

WHITEHAIR et al. (1992c) demonstraram em seus estudos que a realização da perfusão regional do membro, em equinos adultos, com um grama de gentamicina promoveu a concentração de $221,2 \pm 71,4$ µg/mL deste fármaco no líquido sinovial, 24 horas após o procedimento e que quatro administrações de 2,2 mg/kg, a cada seis

horas, via intravenosa, deste mesmo antibiótico, promoveu a concentração de apenas de $7,6 \pm 1,6$ µg/mL, intra-articular. Atualmente, há pesquisas que comprovam que a técnica de perfusão regional do membro de equinos com antibióticos, como gentamicina, ceftiofur, ampicilina, vancomicina e enrofloxacin promove concentrações ósseas, intra-articulares, peri-articulares e nos tecidos perfundidos pelo fármaco, várias vezes maiores que a concentração inibitória mínima dos patógenos, durante várias horas (MURPHEY et al., 1999; WERNER et al., 2003; MARTÍNEZ, 2004; PILLE et al., 2005; ERRICO et al., 2008; GILLIAM et al., 2008).

A perfusão regional tem sido considerada mais eficaz que a administração sistêmica para o tratamento de artrite infecciosa e osteomielite (WHITEHAIR et al., 1992a,b,c; KETTNER et al., 2003), permitindo a eliminação de infecções resistentes à terapia convencional e sua aplicação, em combinação com a antibioticoterapia sistêmica, incrementa as taxas de sobrevivência até valores maiores que 70% (FINSTERBUSH et al., 1970; SANTACHI et al., 1998; PALMER & HOGAN, 1999). Outras afecções dos equinos que tem sido tratadas com resultados satisfatórios são a laminite séptica, a osteíte séptica da falange distal e dos ossos sesamoideos proximais, a artrite séptica das articulações dos dedos, a tenossinovite séptica, a bursite séptica do sesamóide distal e feridas no casco (SANTACHI et al., 1998). Os ossos da porção isolada pelo torniquete também são perfundidos e, neles, a concentração do antibiótico também é elevada (BERTONE, 2003).

Não se conhece o número, nem a frequência de perfusões regionais que se deve realizar para conseguir a cura das infecções ortopédicas. Para o tratamento das infecções ortopédicas clínicas, em cavalos, se têm realizado perfusões únicas (WHITEHAIR et al., 1992a; PALMER & HOGAN, 1999), duplas (DIETZ & KEHNSCHERPER, 1990; WHITEHAIR et al., 1992a), triplas (KETTNER et al., 2003) ou até quádruplas (PALMER & HOGAN, 1999). No entanto, como as características mórbidas de cada caso são diferentes e a combinação de tratamentos aplicados também, o estabelecimento de conclusões generalizadas é muito complicado. Após quatro a seis sessões de perfusão regional, feridas cronicamente infectadas produziram culturas estéreis em pessoas (FINSTERBUSH & WEINBERG, 1972); uma ou duas

perfusões regionais intravenosas tem sido eficazes para curar artrite e tenossinovite em vacas (FESSL & AWAD-MASALMEH, 1975); uma única perfusão regional com antibiótico produziu culturas negativas em dois de três cavalos (WHITEHAIR et al., 1992b,c).

A anfotericina B é um antimicótico pertencente ao grupo dos antibióticos macrolídeos poliênicos, produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, cujo mecanismo de ação se baseia na ligação com os esteróis da membrana celular, provocando alteração funcional com saída de metabólitos essenciais, nucleotídeos e proteínas, levando à morte celular (SANDE & MANDELL, 1987; RICHARDSON & WARNOCK, 1993). Foi isolada em meados de 1955 (GOLD et al., 1956; VANDEPUTTE et al., 1956) e, desde então, apenas poucos agentes com ação antimicótica foram descobertos e tornaram-se viáveis para o tratamento das micoses sistêmicas.

No final dos anos 50, a anfotericina B já era utilizada em alguns casos clínicos e, em 1965, foi o primeiro agente antimicótico a ser aprovado pela United States Food and Drug Administration (U.S. FDA) (WU, 1994; DISMUKES, 2000). Mesmo com sua elevada toxicidade e com a introdução de antimicóticos azólicos sistêmicos na década de 80 (DISMUKES, 2000), a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica têm assegurado que a anfotericina B permaneça como o fármaco de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

O composto contém 37 átomos de carbono formando um anel macrocíclico fechado por lactonização; possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas não-substituídas (heptaeno) e, na porção oposta, uma cadeia poli-hidroxilada com sete grupos hidroxila livres, o que lhe confere característica anfipática. Em uma das extremidades da molécula encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um aminogruppo livre, formando uma cadeia lateral. A molécula tem aproximadamente 24Å de comprimento, ou seja, o equivalente a meia camada de fosfolípídeo (GANIS et al., 1971).

O nome anfotericina deriva da característica anfotérica de sua estrutura molecular, formando tanto sais solúveis em meio ácido como em meio básico (ASHER & SCHURARTZMAN, 1977).

A anfotericina B é pouco solúvel na maioria dos solventes. Com exceção do dimetilsulfóxido (DMSO) e da dimetilformamida, é praticamente insolúvel em soluções aquosas de pH neutro. A solubilidade da anfotericina B em água pode ser aumentada por adição de lauril sulfato de sódio ou desoxicolato de sódio (DOC). A formulação convencional comercialmente utilizada, denominada Anfotericin B® (Cristália), constitui-se de 50 mg de anfotericina B, aproximadamente 41 mg de DOC e 20,2 mg de tampão fosfato. O DOC é empregado para solubilização da anfotericina B, entretanto o sistema não é homogêneo, podendo apresentar em sua constituição três formas diferentes: monomérica, oligomérica e agregados de anfotericina B-DOC (LEGRAND et al., 1992) misturados com micelas puras de DOC (LAMY-FREUND et al., 1991).

Em estudo com membranas bilamelares comparou-se a capacidade de formação de canais iônicos de anfotericina B frente à membrana contendo ergosterol, colesterol e na ausência destes esteróides. Constatou-se que a anfotericina B, tanto na forma monomérica quanto na agregada, pode formar canais em membranas contendo ergosterol, mas somente a forma agregada formou tais canais em membranas contendo colesterol (HUANG et al., 2002). A maior afinidade por ergosterol pode ser notada em estudos nos quais a concentração de anfotericina B necessária para promover permeabilidade foi dez vezes menor para vesículas contendo ergosterol do que para aquelas com colesterol (VERTUT-CROQUIN et al., 1983; SAINT-PIERRE-CHAZALET et al., 1998).

A anfotericina B interage especificamente com o ergosterol, esteróide constituinte exclusivo da parede celular fúngica, levando à formação de poros nas membranas lipídicas (ZYGMUNT, 1966; TEERLINK et al., 1980; BRAJTBURG et al., 1984; BOLARD et al., 1993). A alteração da permeabilidade celular permite, portanto, o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, levando eventualmente à morte celular (BOLARD et al., 1993). Outros experimentos indicaram que danos oxidativos produzidos quando da interação de anfotericina B com a membrana celular

de eritrócitos (BRAJTBURG et al., 1985), *Candida albicans* (SOKOL-ANDERSON et al., 1988) e em leucócitos polimorfonucleares (PMN) (MARZZULLO et al., 1997), apresentaram importante papel no mecanismo de ação lítica do antimicótico.

Assim, embora a anfotericina B possua maior afinidade por ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (WHITE et al., 1989; BOLARD et al., 1993; MORIBE et al., 1999; HUANG et al., 2002).

A ação de anfotericina B sobre as células do sistema imune merece atenção especial, pois este antimicótico é amplamente empregado na terapia de pacientes imunodeprimidos. Estudos indicam que a anfotericina B exerce efeitos moduladores interessantes, interferindo em muitas das propriedades de leucócitos, como na inibição da quimiotaxia (BERNAUDIN et al., 1987), na produção de anticorpos (BOGGS et al., 1991), nas propriedades funcionais dos leucócitos PMN (JULLIEN et al., 1991), na diminuição significativa da fagocitose e na destruição de *Candida albicans* (PALLISTER & WARNOCK, 1989).

O efeito do DOC no metabolismo oxidativo de leucócitos PMN deve ser considerado, pois se relatou a parcial responsabilidade pela inibição da quimiotaxia destas células, quando altas doses de anfotericina B-DOC foram utilizadas (BERNAUDIN et al., 1987).

O aumento do “burst” oxidativo foi mostrado em macrófagos por WILSON e colaboradores (1991), onde sugeriram que anfotericina B ativaria estas células, via efeito direto na membrana plasmática, aumentando a capacidade de produção do ânion superóxido. Outros autores, no entanto, propuseram que o acúmulo intracelular do antimicótico, ainda viável, permitiria sua ação direta sobre o fungo fagocitado (PONCE & PECHÉRE, 1990; FILIPPIN & SOUZA, 2006), fato que auxiliou alguns autores a direcionar o tratamento de infecções fúngicas, cujo agente replicava-se intracelularmente (GRAYBILI & BOCANEGRA, 1995; GARCIA et al., 2000).

Finalmente, um estudo in vivo, tendo como modelo experimental o cobaio, demonstrou que uma única dose de anfotericina B não possui efeito imunossupressor sobre linfócitos e neutrófilos, mas após 3 doses, em dias consecutivos, alterações

quimiotáticas e fagocíticas foram observadas; entretanto, os efeitos eram variáveis e não possuíam um padrão dose-resposta (DRUMMOND et al., 1995).

As reações adversas agudas da anfotericina B, no homem, são: febre, calafrios, tremores, náusea, vômitos e dor de cabeça e, frequentemente, estão relacionados à infusão intravenosa (SCHÖFFSKI et al., 1998; NUCCI et al., 1999; WALSH et al., 1999; MORA-DUARTE et al., 2002). Alterações cardiovasculares como hipotensão, hipertensão e arritmia cardíaca foram observadas com menor frequência (WALSH et al., 1999; MORA-DUARTE et al., 2002). Hipocalemia, hipernatremia, diurese aumentada (GERBAUD et al., 2003), hipomagnesemia, disfunção renal e efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) estão associados com administrações repetidas (SCHÖFFSKI et al., 1998).

O tratamento sistêmico com anfotericina B quase sempre resulta em algum grau de disfunção renal, sendo claramente uma função da dose total (MORA-DUARTE et al., 2002). Um estudo em células renais de ratos, conduzido por VARLAM et al. (2001), sugeriu que a anfotericina B induzia apoptose em células tubulares renais e em células intersticiais, em taxa diretamente proporcional à concentração. Observou-se 90% de apoptose e necrose, com a concentração máxima utilizada (5,0 mg/mL), sendo que em doses menores, mínima apoptose foi relatada.

Efeitos neurotóxicos em pacientes humanos tratados com anfotericina B são raros. Observam-se hipertermia, confusão mental, depressão, delírio, comportamento psicótico, convulsão, tremores, perda de audição, opacidade da visão, dentre outras alterações, acompanhadas por degeneração da bainha de mielina (RACIS et al., 1990). A cardiotoxicidade foi descrita especialmente pela indução da arritmia ventricular, secundária à hipocalemia, em pacientes com função renal diminuída, que são suscetíveis a essa alteração eletrolítica (CRAVEN et al., 1985; SCHÖFFSKI et al., 1998).

A atividade da anfotericina B é máxima na faixa de pH 6,0 a 7,5 e a ação pode ser fungistática ou fungicida, dependendo da concentração sérica e tecidual do antimicótico e da suscetibilidade do patógeno (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

A anfotericina B possui atividade contra a maioria das espécies de *Candida spp* (DAVEY, et al., 1998; CLANCY & NGUYEN, 1999; BURGESS et al., 2000; PFALLER et al., 2002), fungos filamentosos, incluindo o *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus arrhizus* e *Paracoccidioides brasiliensis* (HAHN & HAMDAN, 2000).

A anfotericina B também possui atividade contra *Histoplasma capsulatum* (GONZALES et al., 2000; LI et al., 2000), *Cryptococcus neoformans* (DAVEY et al., 1998), *Coccidioides immitis* e *Blastomyces dermatitidis* (LI et al., 2000). Sua atividade foi considerada limitada contra algumas cepas de *Fusarium spp* (ESPINEL-INGROFF et al., 1997). Cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* também foram suscetíveis a ação da anfotericina B, sendo também empregada na terapia de leishmaniose visceral (DAVIDSON et al., 1991; DURAND et al., 1998) e mucocutânea (AMATO et al., 2000).

Do ponto de vista bioquímico, a resistência aos antibióticos poliênicos poderia estar associada ao aumento ou diminuição dos esteróides da membrana, especialmente ergosterol e seus precursores. Em um estudo recente, YOUNG et al. (2003) conduziram um experimento baseado no fato de que a ação lítica de anfotericina B somente ocorreria se houvesse interação do fármaco com o ergosterol da membrana fúngica. Os autores, então, desenvolveram uma cepa mutante de *Candida lusitanae* ("*C. lusitanae* ERG6") com defeito na biossíntese de ergosterol, na qual foi observada resistência in vitro à anfotericina B. A ausência de ergosterol foi também apontada como responsável pela resistência de patógenos frente à anfotericina B em um estudo anterior. A incubação prévia de promastigotas da *Leishmania mexicana* com cetoconazol (antimicótico que atua na inibição da biossíntese de ergosterol) reduziu a ligação da anfotericina B a essas células e a consequente formação de poros, efeitos que somente ocorreram em função da concentração do imidazólico, que resultou no acúmulo progressivo de lanosterol, com redução drástica de ergosterol (RAMOS et al., 1994).

A terapêutica antimicótica sistêmica não permite ainda obter cura clínica comparável às que se consegue com os antibióticos. O fato de muitas destas infecções surgirem em hospedeiros imunocomprometidos, dificulta ainda mais a eficácia

terapêutica. Até agora, a anfotericina B constitui a base terapêutica das infecções fúngicas graves (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da perfusão regional intravenosa com anfotericina B em membros locomotores de equinos acometidos por pitiose, combinada com a excisão cirúrgica.

Estudar a viabilidade e a eficácia da aplicação de anfotericina B por meio da perfusão regional intravenosa nos membros dos equinos portadores de pitiose.

Determinar os efeitos adversos, locais e regionais, da administração da anfotericina B, na perfusão regional intravenosa nos membros dos equinos.

Avaliar a evolução da reparação cicatricial de feridas de pitiose localizadas nos membros de equinos após perfusão regional intravenosa com anfotericina B.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 16 equinos, jovens e adultos, da raça pantaneira, com escore corporal entre 2 e 3 (HENNEKE et al., 1983), que apresentavam ferida granulomatosa devido à infecção por pitiose, em membro torácico ou pélvico, distalmente às articulações do cotovelo (úmero-radial e úmero-ulnar) ou do joelho (femoro-tibial e femoro-patelar), respectivamente, distribuídos em dois grupos experimentais. Um grupo constituído de 12 equinos, machos (n=4) e fêmeas (n=8), tratados por perfusão regional intravenosa do membro com anfotericina B (Ganf), com idades entre quatro meses e dez anos (média de idade de quatro anos) e pesos entre 80 e 350 kg (média de peso de 247 kg) e outro grupo constituído de quatro animais controles não tratados (Gc), machos (n=2) e fêmeas (n=2), com idades entre dois e 14 anos (média de idade de nove anos) e pesos entre 200 e 450 kg (média de peso de 300 kg) (Apêndice 1). Os animais foram selecionados na região do Pantanal Mato-Grossense (Apêndice 1), permaneceram nas propriedades rurais de origem, alojados em piquetes individuais, livres de áreas alagadiças, mantidos em regime de alimentação à base de capim, suplementação mineral e água *ad libitum*, durante todo o período experimental.

4.2 GRUPOS DE TRATAMENTOS

Grupo Perfusão Regional Intravenosa com Anfotericina B (n=12; Ganf= excisão cirúrgica + termocauterização + perfusão regional intravenosa com anfotericina B): representado pelos 12 animais em que realizou-se excisão cirúrgica, termocauterização

e administração de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro.

Grupo Controle (n=4; Gc= excisão cirúrgica + termocauterização + perfusão regional intravenosa com Ringer lactato): correspondendo aos quatro animais em que se realizou excisão cirúrgica, termocauterização e administração de Ringer lactato, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro.

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

No dia do experimento, os equinos foram contidos em tronco individual e submetidos a exame clínico (FEITOSA, 2004). Avaliou-se a frequência cardíaca (FC; batimentos/minuto) por auscultação torácica, a frequência respiratória (FR; movimentos respiratórios/minuto) pela observação da movimentação do gradil costal, o tempo de preenchimento capilar (TPC; segundos) por compressão digital da gengiva, a motilidade intestinal (classificada como normal, hipomotilidade ou hiperomotilidade) por auscultação abdominal e a temperatura retal (T; °C) por meio de termômetro clínico convencional.

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 PRIMEIRA ETAPA

Os animais foram submetidos a jejum alimentar, doze horas antes do início do experimento. Após avaliação clínica, em ambos os grupos, colocou-se um cateter intravenoso¹, 14G, na veia jugular dos equinos e foi realizada anestesia geral intravenosa, mediante tranquilização com acepromazina² 1%, na dose de 0,1 mg/kg, via intravenosa e após 5 minutos, a administração intravenosa de éter-gliceril-guaiacol³, na dose de 100 mg/kg e indução/manutenção anestésica com cetamina⁴ 10% (2 mg/kg),

¹ BD Angiocath - Becton Dickinson Ind. Cirurg. Ltda, Juiz de Fora – MG, Brasil

² Acepran – UNIVET S/A, São Pulo – SP, Brasil

³ EGG – EHG Agrofarma, Mogi Mirim – SP, Brasil

⁴ Vetaset – Fort Dodge, Campinas - SP, Brasil

associada na mesma seringa, com midazolam⁵ (0,1 mg/kg), via intravenosa. Doses complementares de cetamina 10% (2 mg/kg) associada ao midazolam (0,1 mg/kg) foram realizadas, conforme necessário, para eliminar dor e movimentação durante o procedimento experimental.

Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito lateral, esquerdo ou direito, de acordo com a localização da ferida. Os membros sadios foram contidos com auxílio de cordas e/ou travões e o membro com a ferida de pitiose mantido em posição elevada em relação ao solo, para realização do procedimento experimental.

Procedeu-se a limpeza da ferida e regiões adjacentes com água e sabão e antissepsia com povidona-iodo⁶ e álcool⁷ 70%. Na sequência, foi realizada hemostasia preventiva, por meio de garroteamento do membro, com torniquete de borracha, na região proximal à ferida (em relação ao tronco) e excisão cirúrgica, com lâmina de bisturi⁸ n° 23, do tecido de granulação exuberante e dos “kunkers”, evitando exposição óssea ou penetração articular. Fragmentos cúbicos de 1 cm foram colhidos, mergulhados em solução de formol a 10% e enviados para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica. Na sequência, o torniquete foi lentamente afrouxado para que se realizasse a hemostasia por termocauterização (Figura 1).

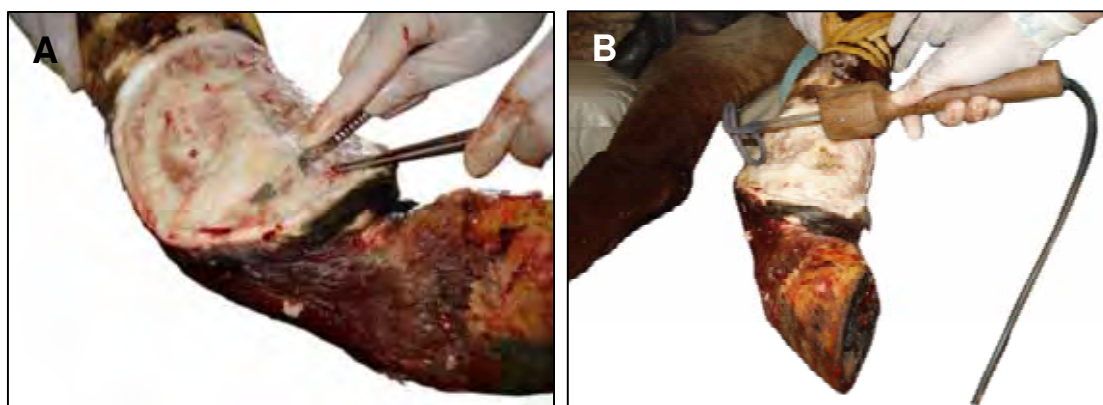


Figura 1. Ilustração de excisão cirúrgica do tecido de granulação exuberante e dos “kunkers”, evitando exposição óssea ou penetração articular (A) e hemostasia por termocauterização (B).

⁵ Dormire – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira – SP, Brasil

⁶ Riodeíne tópico – Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda, São José do Rio Preto – SP, Brasil

⁷ Álcool 70 - Icarai do Brasil, Santa Rita do Passa Quatro – SP, Brasil

⁸ Lâmina de Bisturi - Solidor, São Paulo – SP, Brasil

Após cinco minutos, destinados à reperfusão sanguínea do membro, o garrote de borracha foi reposicionado, padronizando-se duas voltas (360º) em torno do membro, de maneira tensa. A aplicação do torniquete foi realizada pelo mesmo pesquisador, em todos os animais deste estudo, para minimizar variações. Após tricotomia e antissepsia com povidona-iodo, uma veia superficial engurgitada, localizada proximal à ferida e distal ao torniquete, foi canulada, conforme o diâmetro, com cateter intravenoso, números 20, 22 ou 24 G. De acordo com a localização das feridas, as veias ou seus ramos cateterizados foram, no membro torácico, cefálica e digital palmar comum e, no membro pélvico, safena, digital plantar comum e digital dorsal comum.

Após implantação do cateter, administrou-se, no Ganf, 60 mL da solução de anfotericina B⁹ (0,83 mg/mL), composta por 50 mg de anfotericina B (10 mL de diluente), diluída em 50 mL de solução de Ringer lactato¹⁰ e no Gc, 60 mL de solução de Ringer lactato. O volume total foi administrado manualmente, padronizando-se o tempo de infusão em cinco minutos, com auxílio de seringa de 60 mL¹¹ e extensor de cateter (escalpe¹² 21). A infusão das soluções foi realizada pelo mesmo pesquisador, em todos os animais deste estudo, para minimizar variações. O garroteamento, em ambos os grupos, foi mantido por 40 minutos após a administração das soluções (Figura 2), perfazendo um total de tempo de garroteamento de 45 minutos.

⁹ Anfotericin B - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira – SP, Brasil

¹⁰ Ringer com Lactato – HalexIstar Indústria farmacêutica Ltda, Goiânia – GO, Brasil

¹¹ Seringa BD 60mL - Becton Dickinson Ind. Cirurg. Ltda, Juiz de Fora – MG, Brasil

¹² BD Asepto - Becton Dickinson Ind. Cirurg. Ltda, Juiz de Fora – MG, Brasil

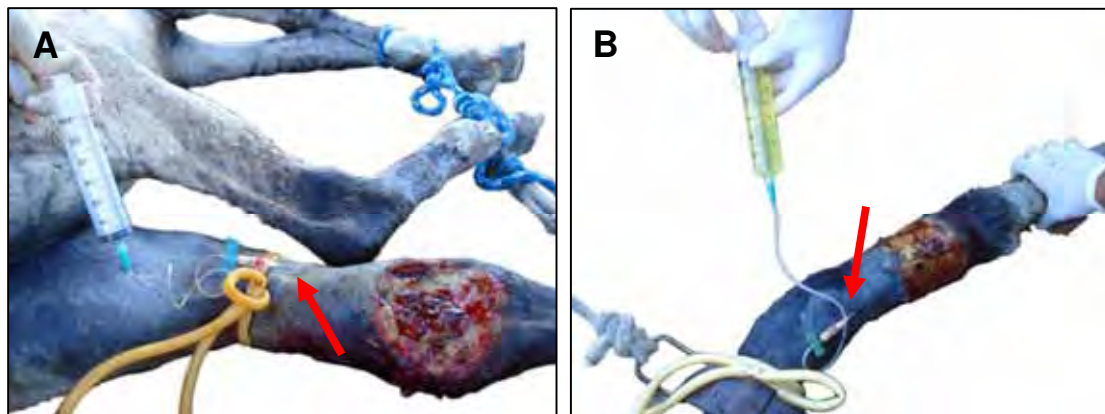


Figura 2. Ilustração da técnica de perfusão regional intravenosa do membro em equinos do grupo tratado com anfotericina B. Notar em A e B, administrações manuais da solução de anfotericina B, com auxílio de seringa de 60 mL e extensor de cateter (escalpe 21). Observar posicionamento dos cateteres intravenosos (setas vermelhas), nas veias safena (em A) e digital palmar comum (em B), localizados proximais às feridas e distais aos torniquetes de borracha.

O cateter foi retirado 10 minutos após a remoção do torniquete e exerceu-se pressão manual sobre a veia canulada, durante 10 minutos, para hemostasia.

Após este procedimento, foi realizada bandagem com algodão¹³ e ataduras¹⁴ na ferida, as quais eram substituídas a cada 3 ou 4 dias, sendo o curativo tópico realizado apenas com povidona-iodo.

Após recuperação anestésica, todos os animais receberam dose única de anti-inflamatório (fenilbutazona¹⁵, 4 mg/kg, via intravenosa).

4.4.2 SEGUNDA ETAPA

No Ganf, nos casos em que “kunkers” ou tecido de granulação exuberante de coloração vermelho-escura ou preta foram observados, nos dias subsequentes ao procedimento experimental, considerou-se necessária a realização, com intervalo de 14 dias, de uma reaplicação de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional

¹³ Algodão Hidrófilo - Cremer, Blumenau – SC, Brasil

¹⁴ Ataduras de Crepon - Cremer, Blumenau – SC, Brasil

¹⁵ Equipalazone – Marcolab, São Paulo – SP, Brasil

intravenosa do membro, sob anestesia geral intravenosa, repetindo-se os procedimentos previamente descritos.

No Gc, não sendo observada remissão da infecção pelo *Pythium insidiosum*, os animais receberam, após 21 dias do procedimento cirúrgico, 67 mg/kg de iodeto de potássio (THOMASSIAN, 2005), via oral, diariamente, até que fossem verificadas ausência de tecido de granulação exuberante, secreção serossanguinolenta e “kunkers”. Associado ao tratamento sistêmico, ressecção e termocauterização foram repetidas, semanalmente, com intuito de remover o tecido de granulação exuberante e os “kunkers”. Curativos diários, com povidona-iodo tópico e bandagens compressivas, foram realizados para minimizar a granulação exuberante e auxiliar a cicatrização da ferida.

4.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A avaliação histopatológica foi realizada no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Cuiabá (LPV-UNIC).

Foi realizada biópsia para confirmação do diagnóstico em cada uma das feridas, nos membros dos equinos. As biópsias contendo “kunkers” (1x1x1 cm), destinados à avaliação histopatológica, foram fixados em solução de formol neutro a 10% e, posteriormente, clivados, processados rotineiramente e incluídos em parafina.

Dessa forma, após fixação e clivagem, o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico. Em seguida, foram submetidos à diafanização pelo xilol e embebição em parafina líquida a 59 °C. Dos fragmentos incluídos em blocos de parafina, foram realizados cortes de 5 µm de espessura, com auxílio de micrótomo rotativo¹⁶. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Prata Metenamina de Grocott (GMS - Grocott's methenamine silver) (LEAL et al., 2001a; SALLIS et al., 2003; PEDROSO et al., 2009). As lâminas coradas foram

¹⁶ Modelo RM2125, Leica Microsystems, São Paulo – SP, Brasil

analisadas em microscopia de luz¹⁷ e fotografadas com câmera fotográfica digital¹⁸ acoplada ao microscópio.

4.6 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

O método imuno-histoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (LPV-UFMT).

Os materiais de biópsia contendo “kunkers” (1x1x1 cm), destinados à imuno-histoquímica, foram imersos em solução de formol neutro a 10%, por um a dois dias, clivados, processados rotineiramente e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo. Os cortes histológicos foram montados nas lâminas, previamente tratadas com solução de gelatina 0,3% e aderidos a estas por meio do calor (60 °C), durante 24 horas, após o que as lâminas foram submetidas à imuno-histoquímica. Utilizou-se o método streptavidina-biotina marcada¹⁹ (LSAB), de acordo com BROWN et al. (1988) e GIMENO et al. (1999).

A desparafinização dos cortes foi realizada em estufa à 60° C, durante 30 minutos. Na sequência, os cortes foram hidratados em soluções de xilol I e II, permanecendo dez minutos em cada solução e com passagens sucessivas, a cada dois minutos, em álcool 100%, 90%, 80% e 70% e, posteriormente, foram lavados em água destilada por dez vezes. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio a 3%, em água destilada, durante 15 minutos, à temperatura ambiente e, as amostras foram, novamente, lavadas em água destilada. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado incubando-se os cortes com leite em pó desnatado a 5%, diluído em solução tampão de fosfato (PBS), durante 15 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato de sódio a 10 mM, com pH 6,0, mediante calor (micro-ondas, potência máxima),

¹⁷ Nikon Eclipse E200, Nikon Instruments Inc., Japão

¹⁸ Samsung Super Vision SVIII, Samsung, Coreia

¹⁹ Large volume DAKO LSAB 2 - Kit Peroxidase Universal K675, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA

por dois minutos, adicionando, conforme necessário, solução tampão (citrato de sódio ou PBS) para evitar a evaporação. Após cinco minutos, destinados à resfriação da amostra, nova lavagem em água destilada foi realizada. A incubação com o anticorpo primário policlonal anti-*Pythium insidiosum* produzido em coelho (cedido à Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT, produzido pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas – LAPEMI da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM) foi realizada na diluição de 1:100, em solução tampão (PBS), mantida por 1 hora, a 37 °C, em estufa e, nova lavagem com água destilada foi realizada. Após este procedimento, incubou-se o complexo streptavidina-biotina (LSAB) com o anticorpo secundário biotinilado universal durante 20 minutos, em temperatura ambiente, seguido pela lavagem com tampão TBS (solução TRIS salina tamponada) e incubação pela streptavidina, também, por 20 minutos, em temperatura ambiente e lavagem com água destilada. A revelação da reação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina²⁰ (DAB), durante 5 a 10 minutos, seguido de lavagem em água destilada. A contra-coloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris, com permanência de um minuto. As lâminas foram lavadas em água corrente e passaram por desidratações sucessivas, a cada um minuto, em banhos de álcool 70%, 80%, 90% e 100% e soluções de xilol III e IV. A montagem das lâminas foi realizada com bálsamo do Canadá²¹. O protocolo para a imuno-histoquímica utilizada neste trabalho foi adaptado de GIMENO et al. (1999).

As lâminas coradas foram analisadas em microscopia de luz e fotografadas em câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio.

O anticorpo primário foi produzido em coelho por meio de uma única inoculação de 20.000 zoósporos de *Pythium insidiosum*, via subcutânea, sem a utilização de adjuvantes. Coletas de sangue a cada 14 dias foram realizadas e a quantificação dos anticorpos foi feita pela técnica de Elisa. O soro utilizado corresponde à coleta no 45º dia, o qual apresentou uma densidade ótica (DO) de 0,281. A DO considerada positiva para coelhos é de 0,105 (PEDROSO et al., 2009).

²⁰ Peroxidase substrate - Kit DAB K3466, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA

²¹ Bálsamo do Canadá – Labsynth, Diadema, SP, Brasil

4.7 AVALIAÇÃO DAS FERIDAS

As feridas foram fotografadas e avaliadas antes do início do procedimento experimental, quanto à localização anatômica, dimensões (cm²), tempo de evolução e macroscopia da lesão.

As feridas foram consideradas como pequenas, quando sua área atingia até 25 cm² e como feridas grandes quando sua área ultrapassava 25 cm².

Durante o período de avaliação, foi realizado o exame da locomoção, observando-se presença de ferida no local de infusão das soluções, aumento de volume, sensibilidade à palpação do membro afetado e claudicação ao passo, a qual foi classificada em: severa (++), discreta (+) e ausente (-).

4.7.1 CLASSIFICAÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

As feridas foram classificadas conforme o seguinte critério:

Ferida tipo 1: a lesão constitui-se de tecido de granulação exuberante, com ulcerações cutâneas extensas, com superfície de aspecto nodular, que drena exsudato serossanguinolento viscoso, geralmente acompanhada por grande aumento de volume local. Ao corte, a coloração das superfícies é esbranquiçada, a consistência firme, com presença de fístulas que se comunicam com cavidades, as quais contém concreções branco-amareladas, de consistência firme, com aspecto de coral (“kunkers”), quase sempre envoltas por exsudato purulento.

Ferida tipo 2: a lesão constitui-se de tecido de granulação não exuberante, de coloração rósea-amarelada, com presença de tecido necrótico e ausência de secreção serossanguinolenta ou “kunkers”.

Ferida tipo 3: evidencia-se linha de epitelização nas margens da lesão, a qual constitui-se de tecido de granulação rosado, plano, com ausência de secreções ou “kunkers”.

Ferida tipo 4: evidencia-se epitelização parcial da lesão, a qual constitui-se de tecido de granulação rosado, plano, com ausência de secreções ou “kunkers”.

Ferida tipo 5: Ferida cicatrizada. Evidencia-se epitelização completa, com pelos na região da lesão.

Ferida tipo R: Ferida recidivante. Evidencia-se tecido de granulação exuberante de coloração vermelho escura ou preta, com presença de secreção serossanguinolenta e “kunkers”.

4.7.2 INTERVALO ENTRE AS AVALIAÇÕES

As feridas foram fotografadas e avaliadas imediatamente antes do início do procedimento experimental (D0) e aos sete (D7), catorze (D14), vinte e um (D21), vinte e oito (D28), trinta e cinco (D35) e sessenta (D60) dias após o procedimento experimental inicial (D0).

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos na fase experimental foram avaliados nos diferentes tempos e apresentados de maneira descritiva, por meio de texto, tabelas e figuras, descrevendo-se as variáveis qualitativas e quantitativas, em forma de frequências (absolutas e relativas) e percentuais de animais que apresentavam determinada característica, em determinado tempo, para cada item avaliado nos grupos perfusão regional intravenosa com anfotericina B (Ganf) e controle (Gc).

5. RESULTADOS

5.1 ANIMAIS

Em ambos os grupos, os equinos com pitiose, no dia 0 (D0), evidenciavam condições corporais de animais muito magros e magros (escore corporal entre 2 e 3). No grupo tratado por perfusão regional intravenosa com anfotericina B (Ganf), todos os animais, no D60, apresentavam condições corporais classificadas como moderadas (escore corporal 5) (Figura 3), enquanto no grupo controle (Gc) o escore corporal dos animais foi mantido entre 2 e 3.

Todos os animais possuíam históricos de insucesso nos tratamentos adotados, seja por excisão do tecido de granulação exuberante e cauterização com ferro incandescente ou por aplicação de produtos cáusticos, como o ácido sulfúrico (solução de bateria) ou mesmo com outros produtos como grafite, zinco e óxido de manganês (pilha seca).



Figura 3. Ilustração do progresso da condição corporal de equinos do grupo tratado com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf), entre a primeira (D0) e a última (D60) avaliação. Notar em A, C e E (D0) animais com condições corporais entre 2 e 3 (muito magros e magros) e, em B, D e F (D60) animais com condições corporais 5 (moderados).

5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os animais de ambos os grupos apresentaram frequências cardíaca (FC entre 28 a 40 batimentos/minuto) e respiratória (FR entre 8 e 16 movimentos respiratórios/minuto), tempo de preenchimento capilar (TPC entre 1 e 2 segundos), motilidade intestinal (normal) e temperatura (T entre 37,2 e 38,9 °C) dentro dos valores considerados fisiológicos para a espécie equina (FEITOSA, 2004), o que permitiu que fossem submetidos aos procedimentos anestésico e cirúrgico.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A análise das alterações por meio da técnica histoquímica de HE revelou, em todos os animais, áreas necróticas eosinofílicas extensas (“kunkers”) e multifocais, na derme superficial e profunda, contendo imagens negativas de estruturas tubuliformes, septadas e com ramificações em ângulo reto (“pseudo-hifas”). Associada às “pseudo-hifas”, notou-se infiltrado inflamatório difuso e intenso, principalmente na periferia dos “kunkers”, predominando eosinófilos e, também, infiltrado neutrofílico e mononuclear moderado (macrófagos, linfócitos, plasmócitos e raras células gigantes de Langerhans) (Figura 4). Havia tecido de granulação exuberante, com proliferação de fibroblastos, fibras colágenas e neovascularização acentuada. As ulcerações na epiderme apresentavam infiltrado neutrofílico moderado a intenso e, por vezes, colônias bacterianas basofílicas superficiais.

Por meio da técnica histoquímica de coloração pela prata (GMS), nas áreas de necrose, visualizou-se grande quantidade de “pseudo-hifas” longas, esparsamente septadas, de contornos irregulares e bem delimitados, seccionadas longitudinal e transversalmente, coradas em preto ou marrom-escuro, tendendo a formar ângulos retos, localizadas principalmente na periferia dos “kunkers”, características de *Pythium insidiosum* (Figura 5). O diagnóstico histopatológico foi de dermatite piogranulomatosa, focal extensa, acentuada, associada a “pseudo-hifas” características de *Pythium insidiosum* (pitiose cutânea), nos 16 animais desta pesquisa.

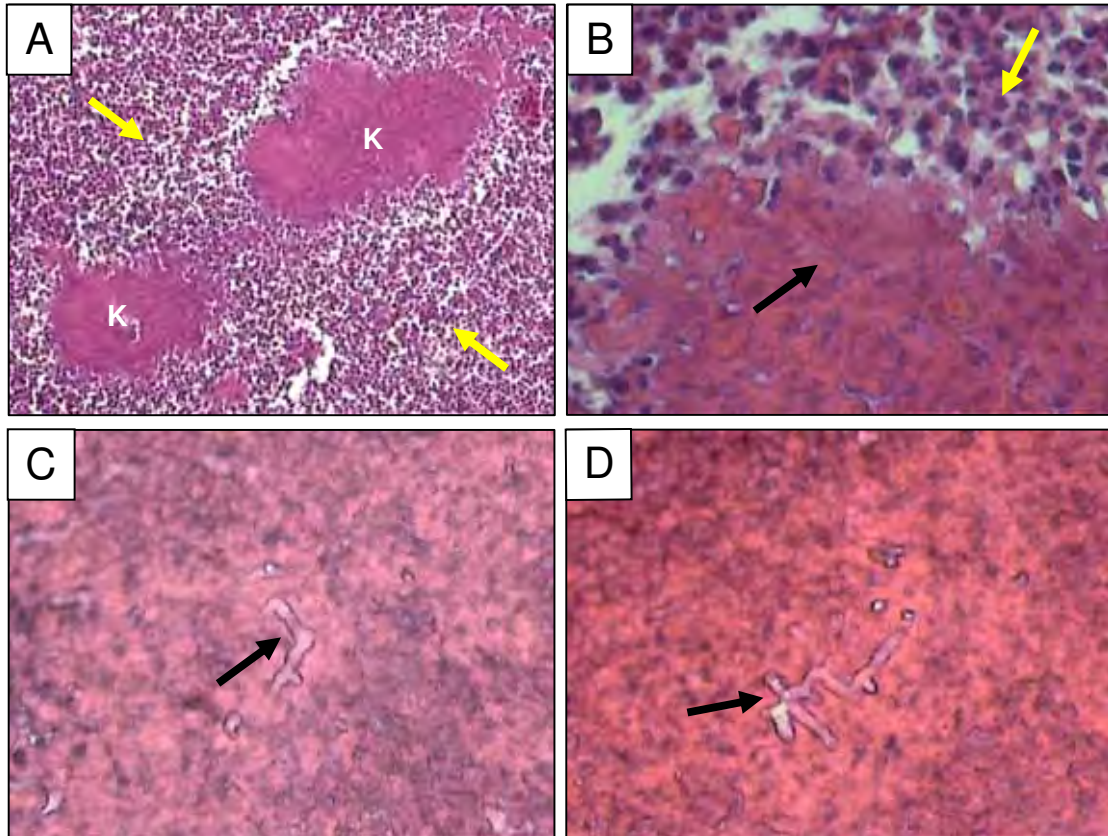


Figura 4. Fotomicrografias mostrando tecido de granulação e “kunkers” das feridas de pitiose nos membros dos equinos. Notar em A, área eosinofílica necrótica extensa - “kunkers” (K) e infiltrado inflamatório (setas amarelas) difuso e intenso (HE, objetiva 10x). Notar em B, infiltrado inflamatório (seta amarela) e imagens negativas de “pseudo-hifas” (seta preta) na área de necrose (HE, objetiva 40x) e, em C e D, imagens negativas de “pseudo-hifas” (seta preta) na área de necrose (HE, objetiva 40x).

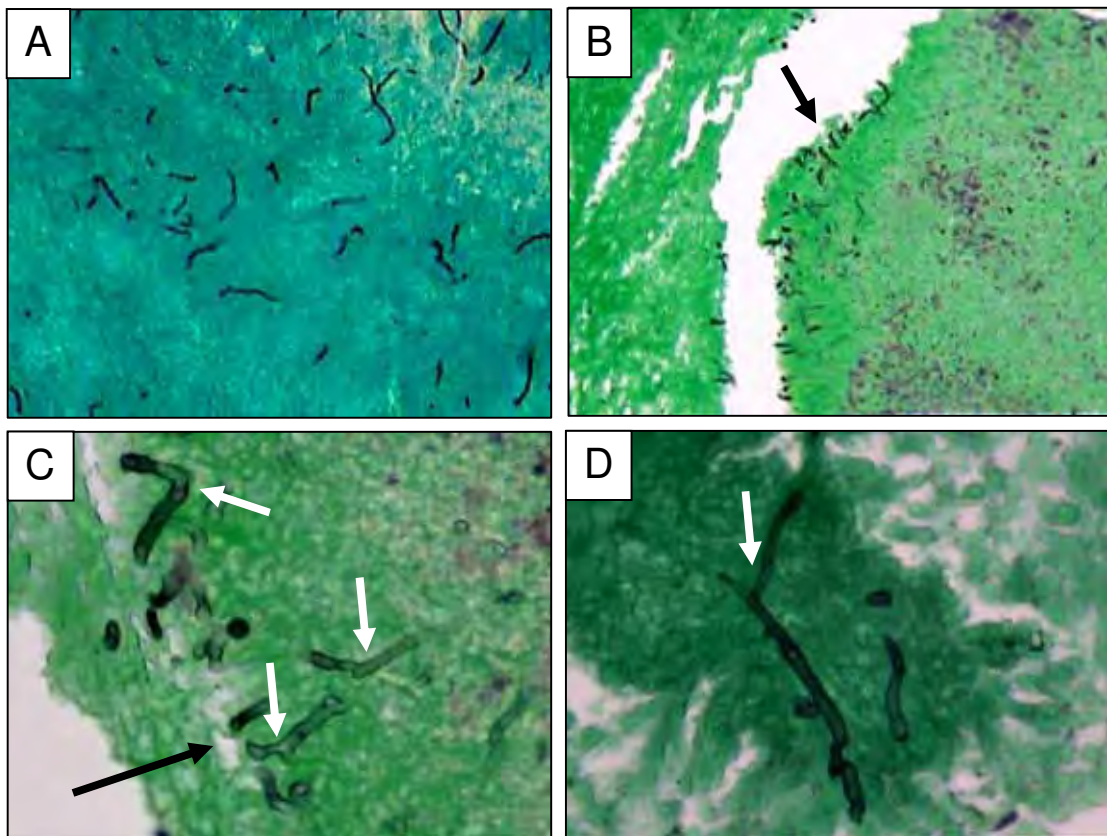


Figura 5. Fotomicrografias mostrando tecido de granulação e “kunkers” das feridas de pitiose nos membros dos equinos. Em A observam-se “pseudo-hifas”, coradas em preto ou marrom-escuro (GMS, objetiva 10x). Notar em B (GMS, objetiva 10x) e C (GMS, objetiva 40x) a localização das “pseudo-hifas” na periferia dos “kunkers” (setas pretas) e, em C e D (GMS, objetiva 40x), a tendência das “pseudo-hifas” em formar ângulos retos (setas brancas), com características morfológicas de *Pythium insidiosum*.

5.4. TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram utilizados 16 animais (12 do Ganf e quatro do Gc) com diagnóstico de pitiose confirmado pela imunomarcção positiva (LSAB) para *Pythium insidiosum*, caracterizada pela visualização de estruturas ramificadas e septadas (Figura 6).

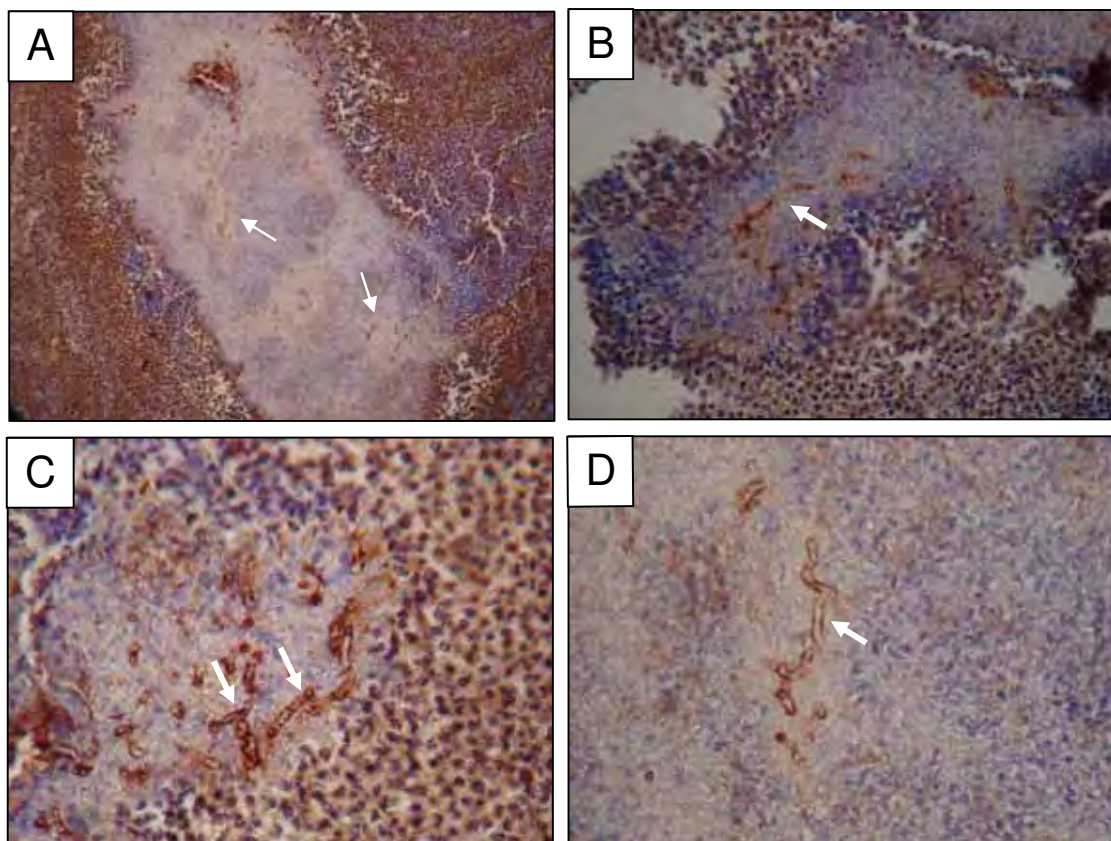


Figura 6. Fotomicrografia mostrando tecido de granulação e “kunkers” extraídos das feridas de pitiose nos membros dos equinos, corados pelo método da imuno-histoquímica para *Pythium insidiosum*. Notar imunomarcção positiva (LSAB) para *Pythium insidiosum* (setas brancas) em A (objetiva 4x), B (objetiva 10x), C e D (objetiva 40x).

5.5 AVALIAÇÃO DAS FERIDAS

5.5.1. Tempo de evolução, dimensão (cm²) e localização anatômica da lesão

Neste estudo pode ser observado que o tempo de evolução apresentado pelas feridas pequenas foi de uma a duas semanas (média de 1,5 semanas) enquanto para as feridas grandes o tempo de evolução foi de um a seis meses (média de 2,6 meses).

Seis potros foram submetidos ao tratamento com anfotericina B (Ganf), sendo que quatro possuíam feridas grandes (33%) e, outros dois, feridas pequenas (17%). Completou-se o grupo com seis equinos adultos, sendo que quatro apresentavam feridas grandes (33%) e, outros dois, feridas pequenas (17%). Assim, o grupo tratado por perfusão regional intravenosa com anfotericina B constituiu-se de 12 animais, sendo que oito possuíam feridas grandes (66%) e quatro apresentavam feridas pequenas (34%) (Tabela 1).

Os três equinos adultos e um potro do grupo controle (Gc) apresentavam feridas grandes (100%), perfazendo um total de cinco feridas, pois um animal apresentava feridas em ambos os membros torácicos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores referentes ao número e porcentagem (%) de equinos que apresentavam feridas grandes (> 25 cm²) e feridas pequenas (< 25 cm²), submetidos à técnica de perfusão regional intravenosa do membro com anfotericina B (Ganf) e de equinos do grupo controle (Gc).

GRUPOS	FERIDA GRANDE (> 25 cm ²)			FERIDA PEQUENA (< 25 cm ²)		
	Potro	Adulto	Total	Potro	Adulto	Total
Ganf	4 (33%)	4 (33%)	8 (66%)	2 (17%)	2 (17%)	4 (34%)
Gc	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)	0	0	0

Cinco animais (42%) do Ganf apresentavam feridas no metacarpo ou metatarso (canela), sendo que em dois animais a lesão estava localizada, também, na articulação metacarpo-/metatarso-falangiana (boleto); em três animais (25%) a ferida estava sobre as falanges proximal e média (quartela), sendo que em um animal havia o envolvimento da articulação metatarso-falangiana (boleto); em três animais (25%) a localização da lesão era sobre o tarso (jarrete) e em um animal (8%) a ferida localizava-se no rádio

(braço). Dentre essas feridas, seis (50%) estavam distribuídas nos membros torácicos e seis (50%) nos membros pélvicos (Tabela 2).

No Gc, três animais (75%) apresentavam as feridas sobre o metacarpo (canela), sendo que um desses apresentava feridas em ambos os membros torácicos e, outro animal (25%), apresentava ferida sobre as falanges proximal e média (quartela). Dentre essas feridas, quatro se desenvolveram nos membros torácicos (80%) e uma abrangia o membro pélvico (20%) (Tabela 2).

Tabela 2. Discriminação da localização anatômica, tempo de evolução e dimensões da ferida (cm²) na primeira avaliação (D0) dos equinos submetidos à técnica de perfusão regional intravenosa do membro com anfotericina B (Ganf) e nos equinos do grupo controle (Gc). São apresentados os animais que necessitaram de reaplicação do fármaco no 14º dia (D14).

ANIMAL	LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA	TEMPO DE EVOLUÇÃO	DIMENSÕES DA FERIDA NO D0 (cm ²)	REAPLICAÇÃO D14
Ganf1	Mcd	2 meses	150	Não
Ganf 2	Mce	3 meses	300	Não
Ganf 3	Mce e AMcFe	2 meses	450	Sim
Ganf 4	Mcd	1 mês	80	Sim
Ganf 5	Rpd	1 semana	25	Não
Ganf 6	Mce	1 semana	25	Não
Ganf 7	ATe	2 semanas	25	Não
Ganf 8	ATe	2 meses	120	Sim
Ganf 9	Mte e AMtFe	6 meses	320	Sim
Ganf 10	F1pe e F2pe	2 meses	150	Não
Ganf 11	AMtFe e F1pe e F2pe	1 mês	425	Sim
Ganf 12	ATd	2 semanas	4	Não
Gc1	Mcd	6 meses	120	-
Gc2	Mcd	2 meses	120	-
Gc3	F1pe e F2pe	2 meses	150	-
Gc4	Mcd e Mce	2 meses	100	-

Legenda: Mcd- metacarpo do membro torácico direito; Mce- metacarpo do membro torácico esquerdo; AMcFe- articulação metacarpo-falangiana do membro torácico esquerdo; Rpd- rádio proximal do membro torácico direito; ATe- articulação társica do membro pélvico esquerdo; Mte- metatarso do membro pélvico esquerdo; AMtFe- articulação metatarso-falangiana do membro pélvico esquerdo; F1pe- primeira falange do membro pélvico esquerdo; F2pe- segunda falange do membro pélvico esquerdo; ATd- articulação társica do membro pélvico direito.

5.5.2 Macroscopia da lesão

No exame clínico inicial (D0), constatou-se, em todos os animais, sinais de prurido na região afetada, caracterizado por auto-mutilação, evidenciada por mordidas ou pelo atrito, da área com a lesão, contra obstáculos.

Os animais, em ambos os grupos, no D0, apresentavam feridas tipo 1. Em todos os casos, a evolução da ferida, descrita pelos proprietários, foi rápida, sendo que, em torno de 15 a 20 dias, as lesões atingiam grande tamanho. Todas as feridas, embora fossem granulomatosas e com secreção abundante, não apresentavam miíase.

Foi verificado que as quatro feridas pequenas (33%) e três feridas grandes (25%) regrediram após serem submetidas à administração única de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro, evoluindo para feridas tipo 2 no D7, feridas tipo 3 no D14 e D21, feridas tipo 4 no D28 e feridas tipo 5 no D35 (Apêndices 2 e 3; Figura 7).

Cinco feridas grandes (42%) exigiram duas administrações de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro. Nestes casos, no D7, as feridas foram classificadas como tipo 2, sendo que, em uma pequena área ou em alguns pontos havia tecido de granulação de coloração vermelha-escura ou preta, com secreção serossanguinolenta e “kunkers”. Entretanto, nesse momento, não foi possível repetir a perfusão regional intravenosa, pois havia edema da primeira aplicação, o que dificultava a localização da veia a ser canulada.

No 14º dia (D14), a ferida ainda apresentava uma pequena área ou alguns pontos com tecido de granulação vermelho-escuro ou preto, com secreção serossanguinolenta e “kunkers”, porém, sem edema do membro, permitindo a realização da reaplicação de anfotericina B. Nas demais regiões destas feridas, era visível a linha de epitelização em suas margens, tecido de granulação plano e de coloração rósea, com ausência de secreções ou “kunkers” (ferida tipo 3).

Aos sete e 14 dias após a readministração de anfotericina B pela perfusão regional intravenosa (D21 e D28) eram evidenciadas feridas tipo 3 e, com 21 dias da segunda administração, que correspondeu a 35 dias desde a primeira aplicação (D35), as feridas foram classificadas como tipo 4. No D60, as feridas foram classificadas como tipo 5 (Apêndices 2 e 3; Figura 8).

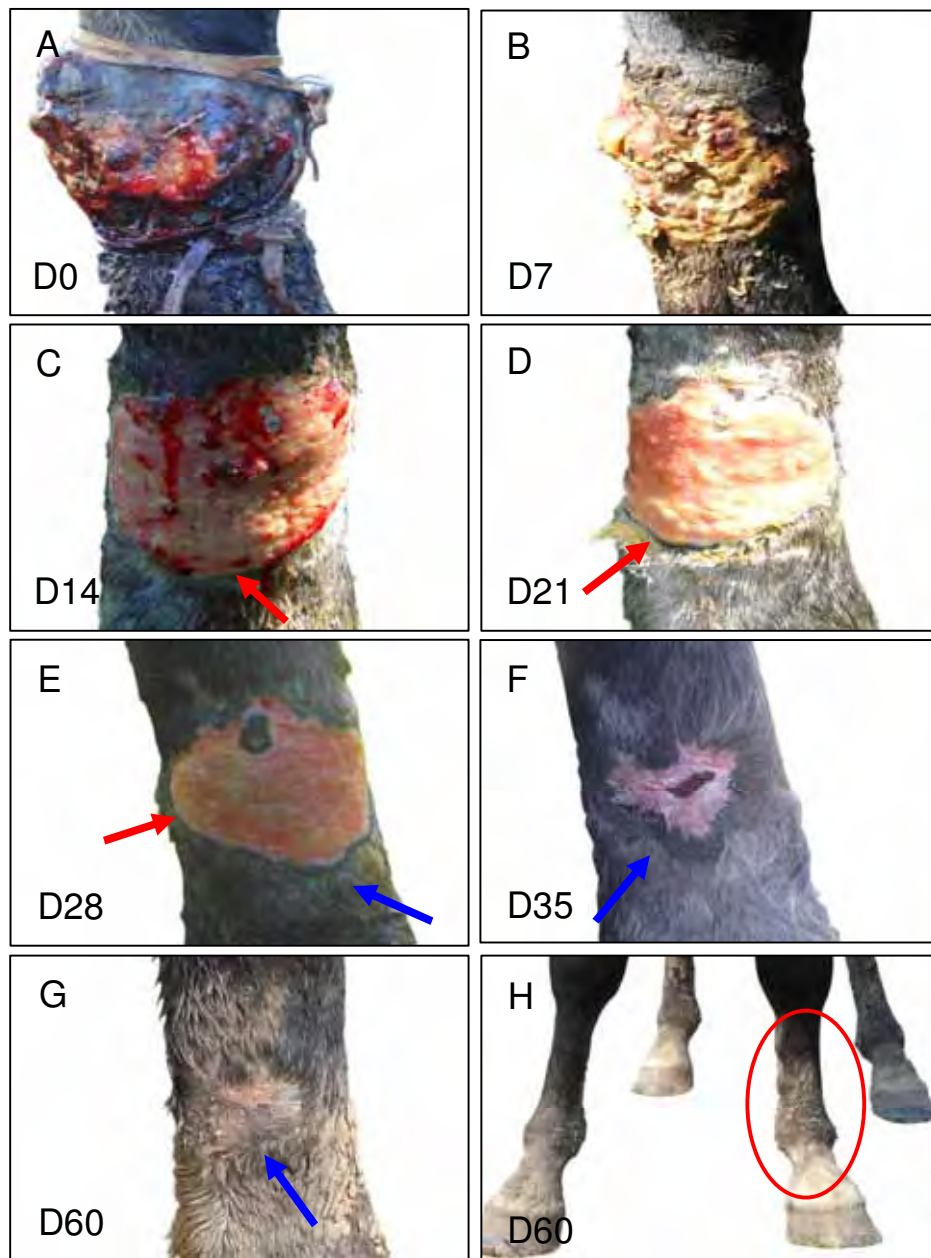


Figura 7. Ilustração da evolução da cicatrização de feridas de pitiose de eqüinos tratados com aplicação única de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf), no primeiro dia (D0) e nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 60 do período pós-operatório (D7, D14, D21, D28, D35 e D60). Notar ferida tipo 1 em A, ferida tipo 2 em B, ferida tipo 3 em C e D, ferida tipo 4 em E e ferida tipo 5 em F e G (seta vermelha – linha de epiteliação; seta azul – tecido epiteliado). Em H observa-se redução do aumento de volume, do membro torácico esquerdo, após cicatrização da ferida (círculo vermelho).

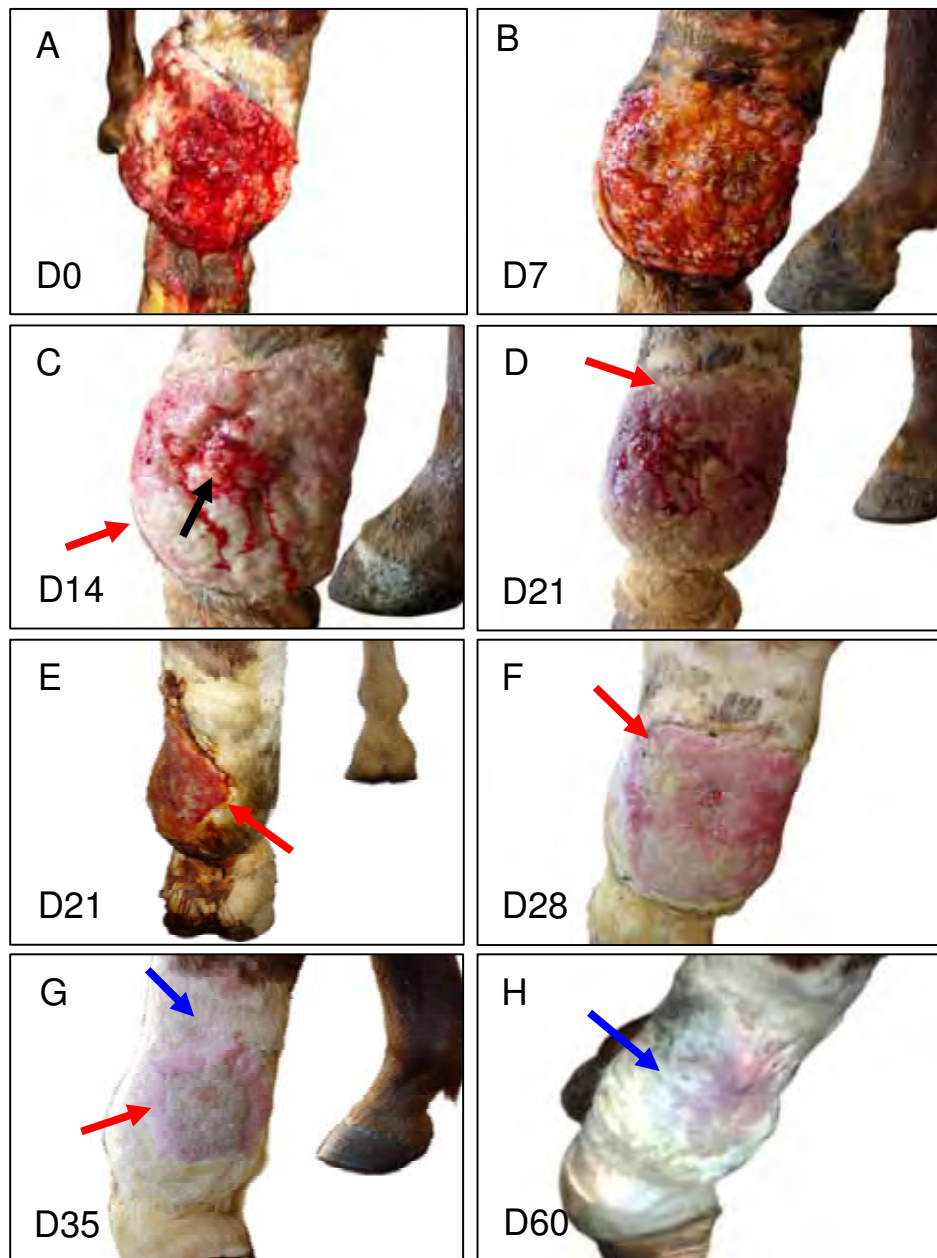


Figura 8. Ilustração da evolução da cicatrização de feridas de pitiose de eqüinos tratados com duas aplicações de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf), no primeiro dia (D0) e nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 60 do período pós-operatório (D7, D14, D21, D28, D35 e D60), com a necessidade de uma reaplicação. Notar ferida tipo 1 em A, ferida tipo 2 em B, ferida tipo 3 em C, D, E e F, ferida tipo 4 em G e ferida tipo 5 em H (seta vermelha – linha de epitelização; seta azul – tecido epitelizado). Observar em C, a presença de área vermelha-escura na ferida (seta preta), caracterizando a necessidade de reaplicação do fármaco.

5.5.3 Avaliação do aparelho locomotor

Todos os animais (100%), em ambos os grupos, apresentavam, antes do tratamento (D0), aumento de volume dos membros afetados, mais acentuado nas áreas adjacentes às feridas granulomatosas com exsudato serossanguinolento, os quais foram reduzidos, após a aplicação de anfotericina B (Ganf), para lesão mínima ou imperceptível, no 60º dia do período pós-operatório (D60).

A administração de anfotericina B pela técnica de perfusão regional intravenosa produziu alterações vasculares no membro, evidenciada por aumento de volume, dor à palpação e lesões cutâneas. No Ganf, quatro animais (33%) apresentaram ulceração no local de administração da anfotericina B e cinco animais (42%) apresentaram aumento de volume do membro e dor à palpação da região perfundida pela anfotericina B. As ulcerações cutâneas cicatrizaram e o aumento de volume e dor à palpação melhoraram progressivamente e, após 14 dias da aplicação (D14) ou 28 dias nos casos de reaplicação (D28), havia remissão total dessas alterações. No Gc não foram evidenciadas alterações no aparelho locomotor decorrentes da perfusão regional intravenosa com Ringer lactato.

No Ganf, 100% dos animais apresentavam, ao passo, claudicação severa no D0; 83% apresentavam claudicação discreta e 17% não apresentavam claudicação no D7; 58% apresentavam claudicação discreta e 42% não apresentavam claudicação no D14; 8% apresentavam claudicação discreta e 92% não apresentavam claudicação no D21. No GNT 100% dos animais apresentaram, ao passo, claudicação severa do D0 ao D21 (Tabela 3; Apêndices 5).

Tabela 3. Valores referentes ao número e porcentagem (%) de equinos, conforme escala pré-estabelecida, que apresentavam claudicação ao passo, nos dias 0, 7, 14 e 21 pós-operatórios, dos animais tratados com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf) e controles (Gc).

GRUPO	D0			D7			D14			D21		
ESCALA	++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-
Ganf	12	0	0	0	10	2	0	7	5	0	1	11
%	100	0	0	0	83	17	0	58	42	0	8	92
Gc	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0
%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0

Legenda: ++: claudicação severa; +: claudicação discreta; -: ausência de claudicação.

5.6 OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

5.6.1 Avaliação da técnica de perfusão regional intravenosa com anfotericina B no tratamento de pitiose em membro de equinos

Cinco animais (três equinos adultos e dois potros) necessitaram de uma readministração de anfotericina B, mediante utilização da técnica de perfusão regional intravenosa do membro (42% dos animais), sendo que todos apresentavam feridas grandes (62,5% dos equinos com feridas grandes). Sete animais (58% dos equinos) receberam administração única de Anfotericina B, por meio da técnica de perfusão regional intravenosa do membro, sendo que três animais apresentavam feridas grandes (37,5% dos equinos com feridas grandes) e quatro feridas pequenas (100% dos animais com feridas pequenas) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores referentes ao número e porcentagem (%) de equinos, com feridas grandes (> 25 cm²) e pequenas (< 25 cm²), que necessitaram de administração única ou uma administração e, após 14 dias, uma reaplicação de anfotericina B, pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf).

Nº DE ADMINISTRAÇÕES	FERIDA GRANDE (> 25 cm ²)	FERIDA PEQUENA (< 25 cm ²)	TOTAL
1	3 (25%)	4 (33%)	7 (58%)
2	5 (42%)	0	5 (42%)

Todos os equinos do Gc (quatro animais – 100%) apresentaram recrudescência da afecção, já observada no D7, caracterizada por feridas tipo R (recidivante). No Gc, não houve regressão e cicatrização das feridas até o D21 (Apêndice 4). Após o 21º dia, os animais do grupo controle foram submetidos à remoção cirúrgica e termocauterização do tecido de granulação exuberante e “kunkers”, associada ao tratamento sistêmico com iodeto de potássio, diário, via oral, até que sinais de cicatrização das feridas fossem notados. Foram necessários, em média, 30 dias de tratamento sistêmico, associado a excisões cirúrgicas e termocauterizações semanais, além de curativos diários com povidona-iodo tópico e bandagens compressivas para que a infecção pelo *Pythium insidiosum* fosse contida e as feridas iniciassem o

processo cicatricial.

Todos os equinos tratados pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro com anfotericina B (Ganf), após excisão cirúrgica e termocauterização, apresentaram completa cicatrização das feridas (Figura 9), exceto um animal que apresentou evolução na cicatrização da ferida, mas, clinicamente, apresentou inapetência, emagrecimento progressivo, anemia e leucocitose com neutrofilia e veio a óbito 45 dias após o início do tratamento. Na necropsia foram coletados “kunkers” no fígado, pulmão e linfonodos mediastínicos, sendo confirmado, ao exame histopatológico, tratar-se de pitiose sistêmica. Foi realizada maceração do osso metacárpico, onde a ferida cutânea se localizava e verificou-se envolvimento ósseo, representado por proliferação óssea (exostose) e osteomielite, devido à infecção por pitiose.

5.6.2 Avaliação do tempo de garroteamento com torniquete

O tempo de garroteamento de 45 minutos foi considerado adequado para tratar feridas de pitiose, por meio da técnica de perfusão regional intravenosa do membro, independente do tamanho ou peso do animal ou localização da ferida. Não foram observadas alterações locais, regionais ou sistêmicas devido ao tempo de garroteamento e ao material usado no garroteamento (compressão) do membro.

5.6.3 Avaliação da dose de anfotericina B

A dose de 50 mg de anfotericina B, diluída em 50 mL de Ringer lactato foi adequada para tratar feridas de pitiose, por meio da técnica de perfusão regional intravenosa do membro, independente do tamanho ou peso do animal ou localização da ferida.

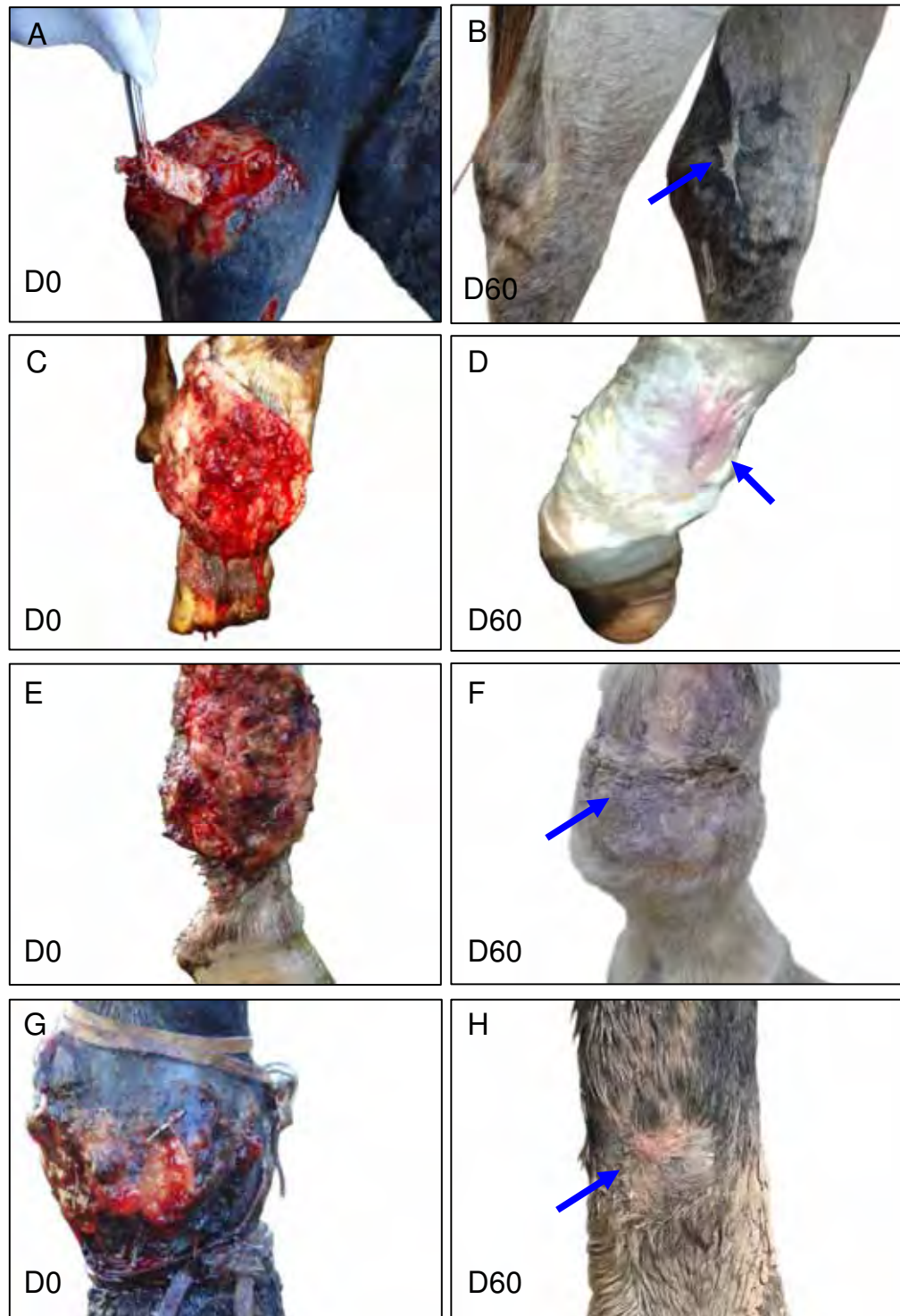


Figura 9. Ilustração da evolução da cicatrização (setas azuis) de feridas de pitiose de equinos tratados com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf), na primeira avaliação (D0) e no último dia (D60) do período pós-operatório.

6. DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido em equinos com feridas granulomatosas de aparência sugestiva de pitiose, criados em áreas urbanas e rurais das cidades de Cuiabá, Várzea Grande, Santo Antônio de Leverger e Poconé – MT, com consentimento, por meio de autorização por escrito, dos proprietários dos animais. O protocolo de tratamento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa e bem-estar animal da Universidade de Cuiabá - UNIC, protocolo nº 0307-177.

Foram empregados animais adultos e jovens, machos e fêmeas, com feridas suspeitas de pitiose, de localização em membro torácico ou pélvico, esquerdo ou direito, em posição distal às articulações do cotovelo e joelho, de forma que houvesse espaço suficiente para posicionamento do torniquete e que favorecesse a canulação de uma veia distal a este, o mais próximo possível da ferida a ser perfundida. Com a perfusão regional intravenosa do membro, buscou-se obter uma concentração elevada do fármaco antimicótico (anfotericina B) no local e nos tecidos circunvizinhos às lesões, conforme descrito por PILLE et al. (2005). Deve-se destacar que, além da exérese cirúrgica, nenhum outro fármaco antimicótico foi administrado concomitantemente, seja por via sistêmica ou localmente.

Todos os animais desse estudo possuíam histórico de habitarem pastos com áreas alagadiças, ambiente considerado como predisponente para que ocorra a infecção pelo *Pythium insidiosum*. Sabe-se que a enfermidade causada por este “pseudo-fungo” quase que invariavelmente está localizada nos apêndices locomotores ou nas partes baixas do corpo que entram em contato com o material vegetal submerso, contaminado pelo “pseudo-fungo”, sendo os membros de equinos, a região anatômica mais frequentemente acometida, pois ao adentrar os alagados para beber

água ou se alimentar de capim, na época chuvosa, no Pantanal Mato-Grossense, os animais adquirem a doença (MENDOZA et al., 1993; SANTURIO et al., 2004).

O histórico, a caracterização clínica macroscópica e histopatológica da ferida encontrados nos animais deste estudo, apresentavam semelhanças com os estudos envolvendo a pitiose equina descritos por BRIDGES & EMMONS (1961), MILLER & CAMPBELL (1982), CARVALHO et al. (1984), MENDOZA et al. (1996) e REIS JR & NOGUEIRA (2002).

Após a análise dos tecidos colhidos das feridas suspeitas de pitiose, encontravam-se áreas de necrose com estruturas cilíndricas filamentosas (“pseudo-hifas”), de coloração verde-escura, com paredes espessadas, com septos ramificados em ângulo reto para a direita, com 2,5 a 8,5 µm de diâmetro, localizados nas margens de uma massa granulomatosa eosinofílica, evidenciados por métodos histoquímicos com coloração argêntica, que se constituíam evidências histológicas fortes da presença da pitiose (MILLER & CAMPBELL, 1984; MENDOZA et al., 1996; HEADLEY & ARRUDA, 2004). Deve-se ressaltar que, em estudo recente, 17% dos casos de diagnóstico histopatológico prévio de pitiose, pela coloração à base de prata, foram considerados negativos após pesquisa do *Pythium insidiosum* por imuno-histoquímica (REIS JR & NOGUEIRA, 2002; HEADLEY & ARRUDA, 2004).

A basidiobolomicose e conidiobolomicose são granulomas cutâneos micóticos causados, respectivamente, por *Basidiobolus haptosporus* e *Conidiobolus coronatus*, facilmente confundidos com a pitiose (MILLER & CAMPBELL, 1984). Sendo assim, neste estudo, a adoção da técnica de imuno-histoquímica assegurou que apenas casos positivos para *Pythium insidiosum* participassem da experimentação, pois de acordo com REIS JR & NOGUEIRA (2002), a técnica de imunoperoxidase apresenta maior especificidade para a detecção do *Pythium insidiosum* em comparação com a coloração pela prata (GMS), corroborando com BROWN et al. (1988). A probabilidade de falso positivo por imuno-histoquímica é pequena, uma vez que as “pseudo-hifas” apresentam moléculas antigênicas com epítomos específicos do reino Stramenopila, não encontradas nas hifas dos fungos zigomicetos (MENDOZA et al., 1997). Apesar da maior especificidade observada na técnica de imuno-histoquímica, a coloração pela

prata (GMS) pode ser empregada para auxiliar na triagem de casos de pitiose (REIS JR & NOGUEIRA, 2002). Dessa forma, os animais estudados foram submetidos aos dois meios de diagnóstico, sendo observado 100% de paridade entre as técnicas, nos casos positivos para o *Pythium insidiosum*.

O fato das feridas de pitiose estarem localizadas nos membros dos equinos poderia reduzir a eficácia do tratamento sistêmico devido a menor capacidade de resposta imune nos membros em relação aos demais tecidos do organismo, em parte, por conta da menor irrigação sanguínea e, por conseguinte, menor aporte de células inflamatórias no periósteo e córtex ósseo (FREY JR et al., 2007). Outro obstáculo à adoção de procedimentos como a exérese cirúrgica seria a proximidade das feridas de pitiose com o tecido ósseo e com as estruturas articulares, restringindo a remoção completa do tecido infeccionado, favorecendo a persistência da infecção. Segundo alguns autores, o tratamento cirúrgico apresentaria bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais, por remover completamente o processo infeccioso, reduzindo a taxa de recidiva da afecção (RODRIGUEZ & LUVIZOTTO, 2000; LEAL et al., 2001a,b; SANTURIO et al., 2004; BIAVA et al., 2007). Independentemente do estágio de evolução da lesão e de sua localização, a resposta à associação entre a exérese cirúrgica e a terapia medicamentosa aqui praticadas, levou à regressão completa, sem recidivas, da pitiose em membros de equinos, mesmo não sendo possível, em alguns casos, a exérese de todo o tecido afetado.

A opção pela remoção cirúrgica do tecido de granulação exuberante das feridas de pitiose, tanto nos animais tratados pela anfotericina B (Ganf), quanto nos que não receberam esse medicamento (Gc), pode ser justificada pelo fato do reparo epitelial das feridas se iniciar apenas na presença de um leito de granulação adequado, pois a existência de um calo é um fator inibidor da mitose epitelial (FOSSUM et al., 2002). Porém, ficou comprovado que, nas condições deste estudo, apenas a remoção cirúrgica e a termocauterização não foram satisfatórias para a remissão da pitiose, ficando patente nos animais não tratados com anfotericina B (Gc), recorrência dos granulomas, com secreção serossanguinolenta e “kunkers”, sete dias após o procedimento cirúrgico. Por outro lado, equinos tratados com anfotericina B, inclusive nos casos onde não foi

possível a completa remoção do tecido comprometido pelo “pseudo-fungo”, observou-se a cicatrização, sem recidivas, em 92% das feridas. O óbito de um animal (8%) deveu-se às complicações da pitiose sistêmica, comprometendo órgãos internos, incluindo os pulmões e o fígado, causando deterioração orgânica.

WORSTER et al. (2000) trataram um caso de pitiose na região de metacarpo, com infecção óssea, por perfusão regional do membro, administrando miconazol (60 mL), na artéria digital palmar lateral, em solução de 10 mg/mL, sob anestesia geral inalatória, associada a três reaplicações de 1,2 mg/kg, a cada 48 h. Em associação, foi utilizado iodeto de sódio, sulfa-trimetoprim e, ainda, outros medicamentos de uso tópico, além de curetagem da ferida. Embora seja o único relato de perfusão regional empregando um antimicótico, torna-se complicado estabelecer a sua eficácia, devido à aplicação intra-arterial e à associação de outras técnicas e fármacos. Em que pese estas diferenças, este relato de caso forneceu subsídios para o desenvolvimento do estudo em tela.

A perfusão regional com antibióticos aminoglicosídeos, como a gentamicina e a amicacina e com antibióticos B-lactâmicos, como a cefazolina e ceftiofur, para tratar infecções em membros (ósseas e articulares) de equinos e bovinos tem sido praticada frequentemente (WERNER et al., 2003; PILLE et al., 2005; PARRA-SANCHEZ et al., 2006; ERRICO et al., 2008). Porém, inexistem dados na literatura, que envolvam a utilização da anfotericina B, por perfusão regional intravenosa de membro.

A infecção por *Pythium insidiosum*, atualmente, é tratada associando-se a excisão cirúrgica com a administração de fármacos antimicóticos via sistêmica, intralesional, tópica e por imunoterapia (LEAL, 2001a,b; SANTURIO et al., 2006a). Frequentemente, a associação de procedimentos aumenta a eficácia dos tratamentos, todavia, segundo HARDY et al. (1988), SMITH et al. (1988) e STENGEL et al. (2001), nos casos de pitiose, o uso de antimicóticos sistêmicos mostra-se pouco eficaz, uma vez que a infecção acarreta alterações locais, as quais afetam de forma negativa a difusão do fármaco desde o compartimento intravascular. A trombose, a isquemia, a necrose tissular, o acúmulo de detritos celulares e a formação de abscessos diminuem o aporte sanguíneo e, conseqüentemente, reduzem a concentração eficaz do

medicamento no sítio de instalação do microorganismo. De fato, esta condição pode impedir que se alcancem as concentrações necessárias para debelar a infecção (FITZGERALD JR, 1984; SMITH et al., 1988; STENGEL et al., 2001). Por outro lado, a redução do pH e a condição de anaerobiose no foco infeccioso diminuem a eficácia dos antibióticos e, conseqüentemente, se as medidas terapêuticas fracassam, a infecção recrudescer (TACK & SABATH, 1985; TUOMANEN, 1987; SMITH et al., 1988; SVENSSON et al., 1997).

Sabe-se que o tratamento das infecções causadas pelo *Pythium insidiosum*, em animais e no homem, é complicado devido às características singulares desse agente infeccioso. A aplicação sistêmica de anfotericina B, como já relatado, não alcança níveis adequados no foco infeccioso e, por isso, deve ser associada à exérese cirúrgica. Todavia, esse antibiótico induz efeitos adversos, incluindo a nefrotoxicidade e anemia (WORSTER et al., 2000). Em tese, a anfotericina B sistêmica não deveria ser eficaz contra o *Pythium insidiosum*, já que este microorganismo não é um fungo verdadeiro e não possui ergosterol na membrana citoplasmática, o principal sítio de ação deste antibiótico (POOLE & BRASHIER, 2003). No entanto, a anfotericina B mostrou-se eficaz em 92% dos casos tratados por meio de perfusão regional intravenosa do membro afetado. Possivelmente, uma das explicações para a eficácia elevada desse antibiótico, aplicado por essa técnica, poderia ser a elevação da concentração tecidual, atingida após a administração regional da anfotericina B. Por outro lado, o prolongamento da retenção tecidual do fármaco não deve ser descartado, pois após a aplicação por perfusão regional intravenosa, o contato da anfotericina B com os constituintes de membrana celular do *Pythium insidiosum* estaria aumentado, dificultando a multiplicação ou mesmo inibindo processos metabólicos vitais para o patógeno.

Desta forma, poder-se-ia hipotetizar que a perfusão regional intravenosa facilitaria a retenção de concentrações elevadas do fármaco no tecido perfundido, ampliando a eficácia terapêutica da anfotericina B, inclusive para microorganismos menos susceptíveis, como o *Pythium insidiosum*, mantendo a concentração inibitória mínima (CIM) constante ou maior. Certamente, pode-se supor que as concentrações locais aumentem até 100 vezes em relação à administração sistêmica, devido à

retenção tecidual que, possivelmente, manteria a concentração tecidual elevada, por períodos próximos a 24 horas (WHITEHAIR et al., 1992b; MURPHEY et al., 1999; BUTT et al., 2001; HARRISS et al., 2002; SCHEUCH et al., 2002; MARTÍNEZ & CRUZ, 2006; PARRA-SANCHEZ et al., 2006). Evidências indicam que concentrações teciduais de antibióticos elevadas por longos períodos, mantêm a CIM e aumentam a eficácia do fármaco contra o patógeno (WERNER et al., 2003; MARTÍNEZ, 2004; PILLE et al., 2005; MARTÍNEZ & CRUZ, 2006; PARRA-SANCHEZ et al., 2006; ERRICO et al., 2008; GILLIAM et al., 2008). Neste particular, sugere-se que, com a perfusão regional intravenosa de anfotericina B, diferentemente da administração intravenosa, é possível exceder ou manter a CIM desse antibiótico, por várias horas, nos membros dos equinos, infectados por *Pythium insidiosum*, ampliando a sua eficácia.

A imunoterapia tem sido preconizada como terapia para pitiose que, quando associada à remoção cirúrgica do tecido acometido, atinge índice de sucesso em 63% dos casos, sendo necessárias, em média, 5 reaplicações por animal (MONTEIRO, 1999). Em estudo recente, FREY JR et al. (2007) empregaram a imunoterapia, em equinos, a cada 14 dias, associada à excisão cirúrgica a cada 7 dias, com eficácia em 50% dos casos de pitiose. A imunoterapia mostrou-se eficaz quando a doença possui até quatro semanas de instalação. Em lesões com mais de oito semanas a resposta ao tratamento é menor (MONTEIRO, 1999; FREY JR et al., 2007). Dessa forma, fica claro a dependência do diagnóstico precoce para aumentar a eficácia da imunoterapia (POOLE & BRASHIER, 2003). Diante do exposto e considerando que o emprego da técnica de perfusão regional intravenosa com anfotericina B, para o tratamento da pitiose em membros de equinos, não depende do tempo de evolução e do tamanho das feridas, obtendo-se a cicatrização em 92% dos casos de feridas de pitiose, sem efeitos adversos maiores, pode-se afirmar que existe vantagem desta técnica sobre a imunoterapia.

Ressalta-se que, o sucesso da terapia independe da infecção ser aguda ou crônica, mas foi verificado que 62,5% das feridas grandes (e, normalmente, crônicas) exigiram repetição da perfusão regional intravenosa com anfotericina B, após 14 dias da primeira aplicação. A reaplicação poderia ser explicada pelo fato das feridas mais

profundas (invasivas), não permitirem a remoção completa, devido ao risco de exposição óssea ou perfuração da cápsula articular. Assim, justifica-se a reaplicação em 42% dos equinos para se obter a cura completa da infecção e cicatrização das feridas, uma vez que estas eram grandes, devido ao tempo de instalação do processo. Por outro lado, deve-se destacar que, em 37,5% dos casos de feridas grandes e crônicas, obteve-se remissão dos sintomas e a cicatrização completa das feridas com apenas uma administração do fármaco. Como se vê, esta técnica parece apresentar um diferencial por não depender do estágio de evolução das feridas, uma vez que os tratamentos atualmente propostos para a pitiose crônica apresentam taxas de insucesso elevadas (MENDOZA et al., 1992; MENDOZA et al., 1997; LEAL et al., 2001a,b; BIAVA et al., 2007). Também, ficou caracterizado, neste estudo que, em 100% das feridas pequenas e agudas, após uma única administração de anfotericina B por perfusão regional intravenosa do membro, obteve-se a cura da pitiose e cicatrização completa das lesões.

Poucos são os estudos comparativos que avaliam a eficácia da perfusão regional intravenosa, na dependência do volume total administrado, da velocidade de infusão, do tipo de torniquete, do período de permanência do garroteamento, do número de perfusões, da realização do debridamento do tecido infectado, das características do agente infeccioso, da sensibilidade do organismo, da dose e concentração, das características físico-químicas e mecanismo de ação do fármaco, além dos fatores inerentes ao paciente e ao caso clínico (WHITEHAIR et al., 1992a; MURPHEY et al., 1999; HARRISS et al., 2002; KETTNER et al., 2003; MARTÍNEZ & CRUZ, 2006). Assim, inexistente uma regra para se empregar a perfusão regional intravenosa, sendo esta técnica utilizada em equinos, calculando-se a dose do fármaco recomendada para uso sistêmico, diluída em 30 a 60 mL (PILLE et al., 2005; MARTÍNEZ & CRUZ, 2006). Alguns autores recomendam a realização da perfusão regional com um terço (1/3) da dose preconizada para uso sistêmico (RICHARDSON, 2003). Porém, doses menores tem sido recomendadas para reduzir o risco potencial de efeitos tóxicos sistêmicos (PILLE et al., 2005). Neste particular, as doses sistêmicas de substâncias antimicóticas podem ser reduzidas a 25% da dose recomendada por quilo de peso corpóreo

(WORSTER et al., 2000). A utilização de 50 mg de anfotericina B diluída em 60 mL (0,83 mg/mL), independente de idade ou peso, correspondeu a variação de doses entre 0,14 a 0,6 mg/kg, as quais foram menores do que a dose de anfotericina B (0,3 a 1,5 mg/kg) recomendada para aplicação sistêmica em eqüinos (McMULLAN et al., 1977; RODRIGUES & LUVIZOTTO, 2000; THOMASSIAN, 2005).

Nos estudos experimentais com a perfusão regional dos membros de equinos, empregando-se antibióticos, não há relatos de efeitos tóxicos regionais nas doses normalmente empregadas, em que pese a grande variação entre elas (WHITEHAIR et al., 1992b; BUTT et al., 2001; HARRIS et al., 2002; SCHEUCH et al., 2002; MARTÍNEZ, 2004). As doses de gentamicina acima de um grama, induziram celulite e necrose tissular (SANTSCHI et al., 1998). A administração de 10.000.000 UI de penicilina sódica causou trombose venosa generalizada em duas vacas, devido ao aumento das concentrações teciduais (STEINER et al., 1990). PARRA-SANCHEZ et al. (2006) relataram vasculite em três eqüinos, após perfusão regional intravenosa com enrofloxacin (1,5 mg/kg). Neste particular, a reaplicação da anfotericina B por perfusão regional intravenosa do membro, com um intervalo de uma semana, mostrou-se inviável em 42% dos animais, pois havia emaciação no local de aplicação, que exigiu um intervalo de 14 dias para a sua regressão. A presença de ulcerações nesse local em 33% dos animais e a dor à palpação do membro (42% dos animais) podem ser relacionadas à flebite decorrente da irritação que fármacos antimicóticos, como a anfotericina B, podem causar, e é, também, frequentemente observada após administração sistêmica intravenosa da dose convencional de anfotericina B (McMULLAN et al., 1977; MILLER, 1981; OLIVEIRA NETO et al., 1998). Deve ser ressaltado que, a solução de anfotericina B após diluição em Ringer lactato, empregada neste estudo, apresentava pH neutro.

De outra forma, nesse estudo, evitavam-se as lesões vasculares devido à punção por agulha hipodérmica, utilizando-se cateteres (20, 22 e 24 G) proporcionais aos diâmetros das veias canuladas, os quais foram removidos ao final de cada procedimento experimental, conforme recomendam MURPHEY et al. (1999); PALMER & HOGAN (1999); BUTT et al. (2001); WERNER et al. (2003); MARTÍNEZ (2004);

ERRICO et al. (2008) e GILLIAM et al. (2008).

O volume perfundido de 60 mL e a duração da aplicação de 5 minutos (taxa de 12 mL/min) foi determinado com base em estudos, onde esse volume foi administrado na porção distal dos membros de equinos, após exsanguinação e a uma taxa de infusão de 2 mL/minuto (WHITEHAIR et al., 1992b,c; SCHEUCH et al., 2002; MARTÍNEZ, 2004) ou em forma de bolus, em um período de tempo variável, de no mínimo 90 segundos, para não exceder a pressão no torniquete e perder o fármaco para a circulação sistêmica (MURPHEY et al., 1999; BUTT et al., 2001; WERNER et al., 2003; PILLE et al., 2005; ERRICO et al., 2008). Embora a exsanguinação prévia à perfusão regional em membros seja recomendada, de forma a reduzir a pressão na árvore vascular (GRICE et al., 1986) e evitar efeitos colaterais (como a síndrome compartimental) e, embora essa medida não tenha sido adotada, não foram observadas alterações locais, regionais ou sistêmicas. Assim, pressupõe-se que, sob uma taxa de infusão adequada, o aumento da pressão intravascular tenha favorecido a difusão tecidual e aumentado a concentração do fármaco nos tecidos infeccionados pelo *Pythium insidiosum* (SCHEUCH et al., 2002; MARTÍNEZ & CRUZ, 2006).

A manutenção do torniquete por 45 minutos (5 minutos durante a administração da anfotericina B e 40 minutos de manutenção do garroteamento) foi diferente do período de 30 minutos preconizado, como seguro, por outros autores (WHITEHAIR et al., 1992b; WHITEHAIR, 1995; BAXTER, 1996; PALMER & HOGAN, 1999; WERNER et al., 2003; PILLE et al., 2005; ERRICO et al., 2008). Com base na evolução cicatricial e pela ausência de qualquer efeito adverso permanente, a retenção sanguínea, por 45 minutos, poderia possuir efeitos positivos do ponto de vista farmacológico, por aumentar a retenção tecidual do antibiótico administrado (HARRISS et al., 2002; KETTNER et al., 2003; MARTÍNEZ, 2004). Os efeitos adversos, frequentes em potros, por aplicação de torniquete, como a isquemia tissular e a formação de êmbolos sépticos, é um dos argumentos contra a perfusão regional em neonatos, como opção terapêutica de primeira escolha (BERTONE, 2003). O efeito adverso frequentemente observado em adultos é o desenvolvimento de hipertensão sistêmica, reversível após a liberação do torniquete, sem efeitos colaterais maiores, mas que requer a interrupção imediata do

procedimento (ABRAHAMSEN et al., 1989). Neste estudo, a aplicação do torniquete durante 45 minutos, mesmo quando realizada em potros, não apresentou alterações locais ou sistêmicas evidentes clinicamente, em que pese a afirmação de outros autores de que torniquetes mantidos por períodos de até 1 hora não apresentam implicações clínicas maiores (WHITEHAIR et al., 1992a,b,c; MURPHEY et al., 1999; HARRISS et al., 2002; KETTNER et al., 2003).

Após a aplicação da anfotericina B, o primeiro sinal de remissão da infecção observado foi a ausência de prurido. Na seqüência, formou-se um tecido de granulação rosado, não exuberante, desde a periferia, em direção ao centro da ferida, provendo uma superfície para a migração epitelial. O processo cicatricial evoluiu naturalmente, sendo possível observar, com sete dias, a fase de debridamento, com 14 dias, a fase de reparo e, a partir de 21 dias, a fase de maturação, com contração das feridas, conforme descrito por FOSSUM et al. (2002). A epitelização ocorreu rapidamente e, entre 35 a 60 dias, a ferida encontrava-se cicatrizada e recoberta por pelos.

Da mesma maneira, todos os equinos, no início deste estudo, apresentavam-se magros, com costelas evidentes e pelos secos e ásperos e, após o tratamento com anfotericina B por perfusão regional intravenosa (Ganf), ganharam peso, mudando as características de pelagem e escore corporal. Devido à evolução rápida da pitiose, os animais acometidos, caso não sejam tratados no início da afecção, geralmente entram em debilidade progressiva, que culmina com a morte (BRIDGES & EMMONS, 1961). Os cavalos perdem peso corpóreo e, frequentemente, morrem de choque tóxico causado pela infecção sistêmica secundária com bactérias gram negativas, associada à perda contínua de sangue e proteínas pela ferida (REIS JR & NOGUEIRA, 2002; POOLE & BRASHIER, 2003), como observado em um dos animais deste estudo.

Finalizando, deve-se ressaltar que, com a realização deste estudo simulou-se uma situação prática, em que os equinos permaneceram nas propriedades de origem, onde foram realizados todos os procedimentos, incluindo-se os curativos do período pós-operatório. Com apenas um ou dois procedimentos anestésicos e cirúrgicos e empregando-se doses de 50 a 100 mg de anfotericina B, obteve-se remissão completa da infecção e, subsequentemente, cicatrização das feridas de pitiose em membros de

equinos, independentemente de cuidados pós-operatórios especiais. Fica patente que a perfusão regional intravenosa do membro de equinos é uma técnica viável e de fácil realização a campo.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a administração de anfotericina B por perfusão regional intravenosa nos membros de eqüinos, em uma ou duas aplicações, associada à remoção cirúrgica, promove a remissão da infecção por *Pythium insidiosum*, com poucas reações adversas sobre os tecidos diretamente expostos ao fármaco, constituindo-se uma alternativa terapêutica, viável e eficaz, para o tratamento de pitiose em membros de eqüinos, promovendo cicatrização completa das feridas.

8. REFERÊNCIAS²²

ABRAHAMSEN, E.; HELLYER, P.W.; BEDNARSKI, R.M.; HUBBELL, J.A.; MUIR III, W.W. Tourniquet-induced hypertension in a horse. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.194, p.386-388, 1989.

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

ALFARO A.A.; MENDOZA L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. *Equine Veterinary Journal*, v.22, p.295-297, 1990.

ALLISON, N.; GILLIS, J.P. Enteric pythiosis in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.196, p.462-464, 1990.

AMATO, V.S.; NICODEMO, A.C.; AMATO, J.G.; BOULOS, M.; AMATO NETO, V. Mucocutaneous leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.46, p.341-342, 2000.

ANTALOVSKY A. Technika mistni mitrozilin na distalinch castech koncetin u skotu. *Veterinary Medicine*, v.7, p.413-420, 1965.

ASHER, I.M.; SCHUWARTZMAN, G. Amphotericin B. *Analytical Profiles of Drug Substances*, v.6, p.1-42, 1977.

²² De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023, agosto 2002

AVEMANN, M. *Prüfung des von Antalovsky angegebenen Verfahrens zur intravenösen regionalen Betäubung im Zehenbereich des Rindes auf Seine Praktische Brauchbarkeit*. [Tesis]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover, 1974.

BAXTER, G.M. Instrumentation and techniques for treating orthopedic infections in horses. *Veterinary Clinics of North American Equine Practitioners*, v.12, p.303-335, 1996.

BERNAUDIN, F.; HATHORN, J.; SCHAUFLE, R.; PIZZO, P.A. Effet in vitro de l'amphotéricine B sur le chimiotactisme des polynucléaires et des "large granular lymphocytes" à activité "natural killer". *Pathologie Biologie*, v.35, p.1403-1407, 1987.

BERTONE, A.L. Infectious arthritis. In: ROSS, M.W.; DYSON, S.J. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003. p. 598-605.

BERTONE, A.L.; CAPRILE, K.A.; DAVIS, D.M. Serum and synovial concentrations of gentamicin administered chronically to horses with experimentally-induced infectious arthritis. *Veterinary Surgery*, v.19, p.57, 1990.

BIAVA, J.S.; OLLHOFF, D.R.; GONÇALVES, R.C.; BIONDO, A.W. Zigomicose em eqüino: revisão. *Revista Acadêmica*, v.5, p.225-230, 2007.

BIER, A. Über einen neuen Weg Localanästhesie an den Gliedmassen zu erzeugen. *Arch klin Chir*, v. 86, 1007-1016, 1908.

BOGGS, J.M.; CHANG, N.H.; GOUNDALKAR, A. Liposomal amphotericin B inhibits *in vitro* T- lymphocyte response to antigen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.35, p.79-885, 1991.

BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. *Journal of Liposome Research*, v.3, p.409-427, 1993.

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, p.715-718, 2005.

BRAJTBURG, J.; ELBERG, S.; BOLARD, J.; KOBAYASHI, G.S.; LEVY, R.A.; OSTLUND, R.E.; SCHLESSINGER, D.; MEDOFF, G. Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. *Journal of Infectious Diseases*, v.149, p.986-997, 1984.

BRAJTBURG, J.; ELBERG, S.; SCHWARTZ, D.R.; VERTUT- CROQUIN, A.; SCHLESSINGER, D.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.29, p.172-176, 1985.

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

BROWN, C.C.; McCLURE, J.J.; TRICHE, P.; CROWDER, B.A. Use of imunohistochemical methods for diagnosis equine pytiosis. *American Journal of Veterinary Research*, v.49, p.1866-1868, 1988.

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

BURGESS, D.S.; HASTINGS, R.W.; SUMMERS, K.K.; HARDIN, T.C.; RINALDI, M.G. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.36, p.13-18, 2000.

BUTT, T.D.; BAILEY, J.V.; DOWLING, P.M.; FRETZ, P.B. Comparison of 2 techniques for regional antibiotic delivery to the equine forelimb: intraosseous perfusion vs. intravenous perfusion. *Canadian Veterinary Journal*, v.42, p.617-622, 2001.

CARVALHO, E.C.Q.; ROSA, C.A.R.R.; CRUZ, L.C.H.; SCAFF, R.M. “*Hyphomyces destruens*”. Agente da “ferida brava” (Hifomicose) em eqüinos do Pantanal de MT. In: XIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1984. Cuiabá, Mato Grosso. Anais... Cuiabá: Sociedade de Veterinária do Mato Grosso, 1984. p.311.

CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.201, p.310-312, 1992.

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

CLANCY, C.J.; NGUYEN, H. Correlation between *in vitro* susceptibility determined by E-test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p.1289-1290, 1999.

CRAVEN, P.C.; GREMILLION, D.H. Risk factors of ventricular fibrillation during rapid amphotericin B infusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 27, p. 868- 871, 1985.

CRUZ A. “Poliartritis y osteomielitis”. *Jornadas Técnicas Veterinarias del Salón Internacional del Caballo*, Sevilla, España. 1999.

DAVEY, K.G.; HOLMES, A.D.; JOHNSON, E.M.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D.W. Comparative evaluation of FUNGITEST and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p.926-930, 1998.

DAVIDSON, R.N.; CROFT, S.L.; SCOTT, A.; MAINI, M.; MOODY, A.H.; BRYCESON, A.D.M. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Lancet*, v.337, p.1061-1062, 1991.

DE COCK, A.W.A.M.; MENDONZA, L.; PADHYE, A.A. AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. The etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.25, p.344-349, 1987.

DIETZ, O.; GÄNGEL, H.; WOBORILL, J. Die intravenöse lokale antibiotikatherapie bei infektiösen erkrankungen im zehenbereich des rindes. *Mh Vet-Med*, v.35, p.729-734, 1980.

DIETZ, O.; KEHNSCHERPER, G. Intravenöse Stauungsantibiose bei pyogenen Infektionen der distalen Gliedmassenabschnitte des Pferdes. *Der Praktische Tierarzt*, v.8, p.30-33, 1990.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. *Clinical Infectious Disease*, v.30, p.653-657, 2000.

DRUMMOND, D.C.; WONG, C.W.; WHITMAN, L.M.; McCORMACK, J.G. The effects of amphotericin B, fluconazole and miconazole on neutrophil and lymphocyte function in a guinea pig model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.36, p.375-384, 1995.

DURAND, R.; PRATLONG, P.M.; RIVOLLET, D.; DUBREUIL-LEMAIRE, M.; HOUIN, R.; ASTIER, A.; DENIAU, M. Leishmania infantum: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.42, p.2141-2143, 1998.

EATON, S. Osseous involvement by *Pythium insidiosum*. *Compendium on Continuous Education for the Practicing Veterinarian*, v.15, p.485-488, 1993.

ERRICO, J.A.; TRUMBLE, T.N.; BUENO, A.C.D.; DAVIS, J.L.; BROWN, M.P. Comparison of two indirect techniques for local delivery of a high dose of an antimicrobial in the distal portion of forelimbs of horses. *American Journal of Veterinary Research*, v.69, p.334-342, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARTLETT, M.; BOWDEN, R.; CHIN, N.X.; COOPER, J.R.; FOTHERGILL, A.; MCGINNIS, M.R.; MENEZES, P.; MESSER, S.A.; NELSON, P.W.; ODDS, F.C.; PASARELL, PETER, J.; PFALLER, M.A.; REX, L.H.; RINALDI, M.G.; SHANKLAND, G.S.; WALSH, T.J.; WEITZMAN, I. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.139-143, 1997.

FEITOSA, F.L.F. Exame clínico geral ou de retina. In: _____. *Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico*. São Paulo: Roca, 2004. p.29-45.

FESSL, L.; AWAD-MASALMEH, M. Antibiotische Versorgung der distalen Extremitäten beim Rind mittels Applikation in eine gestaute Digitalvene. *Wien tierärztl Mschr*, v.62, p.51-53, 1975.

FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, p.167-194, 2006.

FINSTERBUSCH, A.; ARGAMAN, M.; SACKS, T. Bone joint perfusion with antibiotics in the treatment of experimental Staphylococcal infection in rabbits. *Journal of Bone and Joint Surgery*, v.52, p.1424-1432, 1970.

FINSTERBUSCH, A.; WEINBERG, H.; Venous perfusion of the limb with antibiotics for osteomyelitis and other chronic infections. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.54, p.1227-1234, 1972.

FISCHER, J.R.; PACE, L.W.; TURK, J.R.; KREEGER, G.M.; MILLER, M.A.; GOSSER, H.S. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.6, p.380-382, 1994.

FITZGERALD JR, R.H. Antibiotic distribution in normal and osteomyelitic bone. *Orthopedic Clinics of North America*, v.15, p.537-546, 1984.

FOIL, C.S. Update on pythiosis (Oomycosis). In: *The North American Veterinary Conference*, 1996, Orlando, EUA. Proceedings... Orlando: Bayer Animal Health, 1996. p.57-63.

FOSSUM, T.W.; HEDLUND, C.S.; HULSE, D.A.; JONHSON, A.L.; SEIM III, H.B. WILLARD, M.D.; CARROLL, G.L. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: _____. *Cirurgia de Pequenos Animais*. São Paulo: Roca, 2002. p.101-171.

FREY JR., F.; VELLHO, J.R.; LINS, L. A.; NOGUEIRA, C.E.W.; SANTURIO, J.M. Pitiose eqüina na região sul do Brasil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.102, p.561-562, 2007.

GAGNON, H.; FERGUSON, J.G.; PAPICH, M.G.; BAILEY, D.C. Single dose phamacokinetics of cefazolin in bovine synovial fluid after intravenous regional injection. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*, v.17, p.31-37, 1994.

GANIS, P.; AUTABILE, G.; MECHLINKI, W.; SCHAFFNER, C.P. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodo-acetyl derivative. *Journal of the American Chemical Society*, v.93, p.4560-4564, 1971.

GARCIA, A.; ADLER-MOORE, J.P.; PROFFITT, R. Single-dose AmBisome (liposomal amphotericin B) as prophylaxis for murine systemic candidiasis and histoplasmosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, p.2327-2332, 2000.

GERBAUD, E.; TAMION, F.; GIRAULT, C.; CLABAULT, K.; LEPRETRE, S.; LEROY, J.; BONMARCHAND, G. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional amphotericin B to liposomal amphotericin B (AmBisome). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.51, p.473- 475, 2003.

GILLIAM, J.N.; STREETER, R.N.; PAPICH, M.G.; WASHBURN, K.E.; PAYTON, M.E. Pharmacokinetics of florfenicol in serum and synovial fluid after regional intravenous perfusion in the distal portion of the hind limb of adult cows. *American Journal of Veterinary Research*, v.69, p.997-1004, 2008.

GIMENO, E.J.; MASSONE, A.R.; PORTIANSKY, E.L. Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en patología veterinaria. In: *X Curso Internacional de Posgrado en Tecnicas de Inmunohistoquímica, Lectinhistoquímica y Microscopia Eletrônica*, 1999. La Plata, Argentina. Anais... Argentina: Universidad Nacional de La Plata, 1999. p.61-111.

GOAD, M.E.P. Pulmonary pythiosis in a horse. *Veterinary Pathology*, v.21, p.261-262, 1984.

GOLD, N.; STOUT, H.A.; PAGANO, J.F.; DONOVICK, R. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vivo studies. *Antibiotics Annual*, v.1955-1956, p.579-586, 1956.

GONZALES, C.A.; SCOTT, I.U.; CHAUDHRY, N.A.; LUU, K.M.; MILLER, D.; MURRAY, T.G.; DAVIS, J.L. Endogenous endophthalmitis caused by *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. A case report and a literature review. *Ophthalmology*, v.107, p.725-729, 2000.

GONZÁLES, H.E.; TRHEEBILCOK, E.; MONTAÑO, J.; LEÓN, J.V. Tratamiento de la ficomycosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. *Revista IICA*, v.14, p.115-122, 1979.

GRAYBILL, J.R.; BOCANEGRA, R. Liposomal amphotericin B therapy of murine histoplasmosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39, p.1885-1887, 1995.

GRICE, S.C.; MORELL, R.C.; BALESTRIERI, F.J.; STUMP, D.A.; HOWARD, G. Intravenous regional anesthesia: evaluation and prevention of leakage under the tourniquet. *Anesthesiology*, v.65, p.316-320, 1986.

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

HAHN, R.C.; HAMDAN, J.S. Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, p.1997-2000, 2000.

HAUCK-BAUER, R. Untersuchungen über den therapeutischen Nutzen der regionalen intravenösen Verabreichung von Oxytetracyclin in die Vv. Digitalis dorsalis communis III und IV bei Klauen-erkrankung des Rindes [Tesis de grado]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover, 1977.

HARDY, D.J.; HANSON, C.W.; HENSEY, D.M.; BEYER, J.M.; FERNANDES, P.B. Susceptibility of *Campylobacter pylori* to macrolides and fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.22, p.631-636, 1988.

HARRISS, F.K.; GALUPO, L.D.; VAN HOOMGMOED, L.M.; MACDONALD, M.H. Antibiotic delivery to the forelimb digital flexor tendon sheath and metacarpophalangeal joint of horses by three regional limb perfusion techniques. In: 29th Annual Conference of the Veterinary Orthopedic Society, 2002. The Canyons, Utah. *Proceedings...The Canyons: Veterinary Orthopedic Society*, 2002. p.63.

HEADLEY, S.A.; ARRUDA JR., H.N. Pitiose cutânea eqüina: um relato de quatro casos. *Ciência Rural*, v.34, p.289-292, 2004.

HEADLEY, S.A.; ARRUDA JR., H.N.; LEGGI, T.C.S.S; BETT, V. Cutaneous pythiosis in a slaughtered horse: a case report. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.69, p.109-112, 2002.

HEALTH, J.A.; KIEHN, T.E.; BROWN, A.E.; LAQUAGLIA, M.P.; STEINHERZ, L.J.; BAERMAN, G.; WONG, M.; STEINHERZ, P. G. *Pythium insidiosum* pleuropneumonia complicating pneumonia in a child with leukemia. *Clinical Infectious Diseases*, v.35, p.60-64, 2002.

HENNEKE, D.; POTTER, G.; KREIDER, J.; YEATES, B. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, v.15, p.371-372, 1983.

HOWERTH, E.W.; BROWN, C.C.; CROWER, C. Subcutaneous pythiosis in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.1, p.81-83, 1989.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J. DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophysical Journal*, v.83, p.3245-3255, 2002.

JULLIÈN, S.; CAPUOZZO, E.; SALERNO, C.; CRIFÒ, C. Effects of polyene antibiotics on the activation of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical Pharmacology*, v. 41, p. 2037-2040, 1991.

KAUFMAN, L.; MENDOZA, L.; STANDARD, P.G. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p.1887-1890, 1990.

KETTNER, N.U.; PARKER, J.E.; WATROUS, B.J. Intraosseous regional perfusion for treatment of septic physisitis in a two-week-old foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.222, p.346-350, 2003.

KNOTTEMBELT, D.C.; PASCOE, R.R. *Afecções e Distúrbios do Cavalo*. Barueri: Editora Manole, 1998, 432p.

LAMY-FREUND, T.M.; SCHREIER, S.; PEITZSCH, R.M.; REED, W.F. Characterization and time dependence of amphotericin B: deoxycholate aggregation by quasielastic light scattering. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.80, n.3, p.262-266, 1991.

LANGER, K.; SEIDLER, C.; PARTSCH, H. Ultrastructural study of the dermal microvasculature in patients undergoing retrograde intravenous pressure infusions. *Dermatology*. v.192, v.103-109, 1996.

LEAL, A. T.; SANTURIO, J M ; MONTEIRO, A. B.; KOMMERS, G. D.; NOMURA, L. D.; JUNIOR, P. S. Pitiose eqüina com envolvimento de linfonodos. In: *IV Jornada Integrada de Pesquisa, Extensão e Ensino*, 1997. Santa Maria, RS. Anais...Santa Maria: Jornada Integrada de Pesquisa, Extensão e Ensino, 1997. p.729.

LEAL, A.B.M.; LEAL, A.T.; SANTURIO, J.M.; KOMMERS, G.D.; CATTO, J.B. Pitiose eqüina no Pantanal brasileiro: aspectos clínicos patológicos de casos típicos e atípicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, p.151-156, 2001a.

LEAL, A.T.; LEAL, A.B.M.; FLORES, E.F.; SANTURIO, J.M. Pitiose. *Ciência Rural*, v.31, p.735-743, 2001b.

LEGRAND, P.; ROMERO, E.A.; COHEN, B.E.; BOLARD, J. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.36, p.2518-2522, 1992.

LI, R.; CIBLAK, M.A.; NORDOFF, N.; PASARELL, L.; WARNOCK, D.W.; MCGINNIS, M.R. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, p. 1734-1736, 2000.

LLOYD, K.C.; STOVER, S.M.; PASCOE, J.R.; ADAMS, P. Synovial fluid pH, cytologic characteristics and gentamicin concentration after intra-articular administration of the drug in an experimental model of infectious arthritis in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v.51, p.1363-1369, 1990.

LUVIZARI, F.H.; LEHMKUHL, R.C.; SANTOS, I.W. Pitiose eqüina no estado do Paraná: primeiro relato de caso. *Archives of Veterinary Science*, v.7, p.99-102, 2002.

MALECAZE, F.; LINAS, M.D.; GAZAGNE, C.; PAGOT, V.; MATHIS, A. SEQUELA, J.P. Diffusion intraoculaire des antifongiques et consequences thérapeutiques dans les mycoses oculaires. *Journal de Mycologie Médicale*, v.2, p.73-76, 1992.

MARIELLO, K. A.; DE BOER, D. J. Enfermidades da pele. In: REED, S., M.; BAYLY, W. M. *Medicina Interna Equina*. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. p.460-461.

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. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v.81, p.483-485, 2006.

MARTÍNEZ, L.R. Valoración de la perfusion regional de la porción distal de la extremidade anterior del caballo con vancomicina: estudio experimental. 175 f. Tese (Doutorado em Veterinaria) - Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 2004.

MARTÍNEZ, L.R.; CRUZ, A.M. Antimicrobial regional limb perfusion in horses. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.228, p.706-712, 2006.

MARZZULLO, L.; SOUZA, L.C.; CAMPA, A. Effect of amphotericin B associated with a lipid emulsion on the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes. *General Pharmacology*, v.27, p.203-207, 1997.

McILWRAITH, C.W. Treatment of infectious arthritis. *Veterinary Clinics of North American Large Animal Practice*, v.5, p.363-379, 1983.

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

MEIRELES, M.C.A.; RIET-CORREA, F.; FISCHMAN, O.; ZAMBRANO, A.F.; ZAMBRANO, M.S.; RIBEIRO, G.A. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses*, v.36, p.139-142, 1993.

MENDONZA, L.; HERMANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycetus pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.2967-2973, 1993.

MENDONZA, L.; KAUFMAN, L.; MANDY, W.; GLASS, R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.4, p.715-718, 1997.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetus pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal of Medical Mycology*, v.6, p.151-164, 1996.

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

MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; STANDARD, P. Antigenic relationship between the animal and human pathogen *Pythium insidiosum* and nonpathogenic *Pythium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v.25, p.2159-2162, 1987.

MENDOZA, L.; VILLALOBOS, J.; CALLEJA, C.E.; SOLIS, A. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. *Mycopathologia*, v.119, p.89-95, 1992.

MILLER, R.I. Investigations into the biology of three phycomycotic agents pathogenic for horses in Australia. *Mycopathologia*, v.81, p.23-28, 1983.

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

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

MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. *Veterinary Pathology*, v.21, p.325-332, 1984.

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

MOORE, R.D.; LIETMAN, P.S.; SMITH, C.R. Clinical response to aminoglycoside therapy: Importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *Journal of Infectious Disease*, v.155, p. 93-99, 1987.

MOORE-LANDECKER J. Zoosporic fungi. In:____. *Fundamentals of the Fungi*. 4.ed New Jersey: Prentice Hall, 1996. p.33-81.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A.L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMITANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *The New England Journal of Medicine*, v.347, p.2020-2029, 2002.

MORIBE, K.; MARUYAMA, K.; IWATSURU, M. Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes. *International Journal of Pharmacology*, v.193, p.97-106, 1999.

MORTON, L.D.; MORTON, D.G.; BAKER, G.J.; GELBERG, H.G. Chronic eosinophilic enteritis attributed to *Pythium sp* in a horse. *Veterinary Pathology*, v.28, p.542-544, 1991.

MURPHEY, E.D.; SANTACHI, E.M.; PAPICH, M.G. Local antibiotic perfusion of the distal limb of horses. In: 40th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioner, 1994. Vancouver, Canadá. *Proceedings...* Lexington: American Association of Equine Practitioners. p.141-142.

MURPHEY, E.D.; SANTACHI, E.M.; PAPICH, M.G. Regional intravenous perfusion of the distal limb of horses with amikacin sulfate. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*, v.22, p.68-77, 1999.

MURRAY, D.R., LADDS, P.W., JOHNSON, R.H.; POTT B.W. Metastatic phycomycosis in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.172, p.834-836, 1978.

NEWTON, J.; SCHUMACHER, J. Pythiosis. In: ROBINSON, N. E. *Current Therapy in Equine Medicine*. Philadelphia: WB. Saunders Company, 1997. p.396-397.

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, v.32, p.175-184, 2002.

NUCCI, M.; LOUREIRO, M.; SILVEIRA, F.; CASALL, A.R.; BOUZAS, L.F.; VELASCO, E.; SPECTOR, N.; PULCHERI, W. Comparison of the toxicity of amphotericin B in 5% dextrose with that of amphotericin B in fat emulsion in a randomized trial with cancer patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p.1445-1448, 1999.

OLIVEIRA NETO, A.F.; PAIS, L.P.F.; ALVES, S.T. Utilização da anfotericina B no tratamento da paracoccidioidomicose. *Revista Universidade de Alfenas*, v.4, p.71-74, 1998.

PALLISTER, C.J.; WARNOCK, D.W. Effect of antimicrobial and antineoplastic drugs alone and in combination on the phagocytic and candidacidal function of human polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.23, p.87-94, 1989.

PALMER, S.E.; HOGAN, P.M. How to perform regional limb perfusion in the standing horse. In: 45th Annual Convention of American Association of Equine Practitioner, 1999. Albuquerque, Novo México. *Proceedings...* Lexington: American Association of Equine Practitioners, 1999. p.124-127.

PARRA-SANCHEZ, A.; LUGO, J.; BOOTHE, D.M.; GAUGHAN, E.M.; HANSON, R.R.; DURAN, S. BELKNAP, J.K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of enrofloxacin and low dose of amikacin administered via regional intravenous limb perfusion in standing horses. *American Journal of Veterinary Research*, v.67, p.1687-1695, 2006.

PEDROSO, P.M.O.; BEZERRA JR, P.S.; PESCADOR, C.A.; DALTO, A.G.C.; COSTA, G.R.; PEREIRA, D.I.B.; SANTURIO, J.M.; DRIEMEIER, D. Diagnóstico imunoistoquímico de pitiose cutânea em eqüinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.37, xx-xx, 2009 (artigo no prelo).

PEREIRA, D.I.B.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; ARGENTA, J.S.; CAVALHEIRO, A.S.; FERREIRO, L. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. *Ciência Rural*, v.38, p.143-147, 2008.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida spp.* isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, p.852-856, 2002.

PILLE, F.; BAERE, S.; CEELLEN, L.; DEWULF, J.; CROUBELS, S.; GASTHUYS, F.; BACCKER, P.; MARTENS, A. Synovial fluid and plasma concentrations of ceftiofur after regional intravenous perfusion in the horse. *Veterinary Surgery*, v.34, p.610-617, 2005.

PONCE, E.; PECHÉRE, J.C. Activity of amphotericin B and itraconazole against intraphagocytic *Candida albicans*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v.9, p.738-744, 1990.

POOLE, H. M.; BRASHIER, M.K. Equine Cutaneous Pythiosis. *Compendium*, v.25, p.229-235, 2003.

PRENTICE, D.E.; WYN-JONES, G.W.; JONES, R.S.; JAGGER, D.W. Intravenous regional anaesthesia of the bovine foot. *Veterinary Record*, v.94, p.293-295, 1974.

PURCELL, K.L.; JOHNSON, P.J.; KREEGER, J.M.; WILSON, D.A. Jejunal obstruction caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.205, p.337-339, 1994.

RACIS, S.P.; PLESCIA, O.J.; GELLER, H.M.; SCHAFFNER, C.P. Comparative toxicities of amphotericin B and its monomethyl ester derivative on glial cells in culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.34, p.1360-1365, 1990.

RAMOS, H.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; BOLARD, J.; COHEN, B.E. Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.38, p.1079-1084, 1994.

REIS JR. L.; NOGUEIRA, R.H.G. Estudo anatomopatológico e imunoistoquímico da pitiose em eqüinos naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, p.358-365, 2002.

REIS JR., J.L.; CARVALHO, E.C.Q.; NOGUEIRA, R.H.G.; LEMOS, L.S.; MENDOZA, L. Disseminated pythiosis in three horses. *Veterinary Microbiology*, v.96, p.289-95, 2003.

RICHARDSON, D.W. Local antimicrobial delivery in equine orthopedics. In: 13th Annual American College of Veterinary Surgeons Veterinary Symposium, 2003. Washington DC, EUA. *Proceedings...* Washington DC: American College of Veterinary Surgeons. p.162.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Antifungal drugs. In:____. *Fungal Infection – Diagnosis and Management*. London: Blackwell, 1993. p.17-43.

RODRIGUES, C.A.; LUVIZOTTO, M.C.R. Zigomicose e pitiose cutânea em eqüinos: diagnóstico e tratamento. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, v.3, p.3-11, 2000.

SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; THOMAS, C.; DUPEYRAT, M.; GARY-BOBO, C.M. Amphotericin B-sterol complex formation and competition with egg phosphatidylcholine: a monolayer study. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.944, p.477-486, 1988.

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

SANDE, M.A.; MANDELL, G.L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. p.799-807.

SANTOS, M.N., LONDERO, A.T. Zigomicose subcutânea em cavalos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.9, p.7-8, 1974.

SANTOS, M.N.; METZDORF, L.L.; BRAGA, M. M.; WOLLE, C.A. Pitiose cutânea em eqüinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.7, p.57-61, 1987.

SANTSCHI, E.M.; ADAMS, S.D.; MURPHEY, E.D. How to perform equine intravenous digital perfusion. In: 44th Annual Convention of American Association of Equine Practitioner, Baltimore, Maryland, EUA. *Proceedings...* Lexington: American Association of Equine Practitioners, 1998. p.198-201.

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

SANTURIO, J.M.; CATTO, J.B.; CAMASTRI FILHO, J.A.; LEAL, A.T.; LEAL, A.B.M. Ferida da moda: epidemiologia, diagnóstico, tratamento e experiência com eqüinos infectados no Pantanal. *Comunicado Técnico Embrapa Pantanal*, v.34, p.1-8, 2004.

SANTURIO, J.M.; LEAL, A.T.; LEAL, A.B.; ALVES, S.H.; LUBECK, I.; GRIEBELER, J.; COPETTI, M.V. Teste de ELISA indireta para o diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, p.47-50, 2006b.

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

SATHAPATAYAVONGS, B.; LEELACHAIKUL, P.; PRACHAKTAM, R.; ATICHARTAKARN, V.; SRIPHOJANART, S.; TRAIRATVORAKUL, P.; JIRASIRITHAM, S.; NONTASUT, S.; EURVILAICHIT, C.; FLEGEL, T. Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, v.159, p.274-280, 1989.

SCHEUCH, B.C.; VAN HOOOGMOED, L.M.; WILSON, W.D.; SNYDER, J.R.; MACDONALD, M.H.; WATSON, Z.E.; STEFFEY, E.P. Comparison of intraosseous or intravenous infusion for delivery of amikacin sulfate to the tibiotarsal joint of horses. *American Journal of Veterinary Research*, v.63, p.374-380, 2002.

SCHÖFFSKI, P.; FREUND, M.; WUNDER, R.; PETERSEN, D.; KÖHNE, C.H.; HECKER, H.; SCHUBERT, U.; GANSER, A. Safety and toxicity of amphotericin B in glucose 5% or intralipid 20% in neutropenic patients with pneumonia or fever of unknown origin: randomized study. *British Medical Journal*, v.317, p.379- 384, 1998.

SCHURKO, A.M.; MENDOZA, L.; DE COCK, A.W.A.M.; BEDARD, J.E.J.; KLASSEN, G.R. Development of a Species-Specific Probe for *Pythium insidiosum* and the Diagnosis of Pythiosis. *Journal Clinical Microbiology*, v.42, p.2411-2418, 2004.

SEDRISH, S.A.; MOORE, R.M.; VALDES-VASQUES, M.A.; HAYNES, P.F.; VICEK, T. Adjunctive use of a neodymium:yttrium-aluminum garnet laser for treatment of pythiosis granulomas in two horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.211, p.464-465, 1997.

SEKHON, A.S.; PADHYE, A.A.; GARG, A.K. *In vitro* sensitivity of *Penicillium marneffe* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. *European Journal of Epidemiology*, v.8, p.427-432, 1992.

SHENEP, J.L.; ENGLISH, B.K.; KAUFMAN, L.; PEARSON, T.A.; THOMPSON, J.W.; KAUFMAN, R.A.; FRISCH, G.; RINALDI, M.G. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clinical Infectious Diseases*, v.27, p.1388-1393, 1998.

SILVA, R.A.; AROSEMENA, N.A.; HERRERA, H.M; SAHIB, C.A.; FERREIRA, M.S. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-Grossense, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.60, p.167-171, 1995.

SMITH, S.M., ENG, R.H., CHERUBIN, C.E. Conditions affecting the results of susceptibility testing for the quinolone compounds. *Chemotherapy*, v.34, p.308-314, 1988.

SOKOL-ANDERSON, M.L.; SLIGH J.E.; ELBERG, S.; BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Role of cell defence against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.32, p.702-705, 1988.

STANEK, C.; FESSL, L.; AWAD-MASALMEH, M. Penicillin and ampicillin levels in pathologically altered tissue following regional intravenous administration of antibiotics in cattle legs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, v.97, p.162-166, 1984.

STEINER, A.; OSSENT, P.; MATHIS, G.A. Die intravenöse Stauungsanästhesie/-antibiose beim Rind – Indikationen, Technik, Komplikationen. *Schweiz Arch Tierheilk*, v.132, p.227-237, 1990.

STENGEL, D.; BAUWENS, K.; SEHOULI, J.; EKKERNKAMP, A.; PORZSOLT, F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *Lancet Infectious Diseases*, v.1, p.175-188, 2001.

SVENSSON, E.; HANBERGER, H.; NILSSON, L.E. Pharmacodynamic effects of antibiotics and antibiotic combinations on growing and nongrowing *Staphylococcus epidermidis* cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, p.107-111, 1997.

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

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

TACK, K.J.; SABATH, L.D. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiosis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy*, v.31, p.204-210, 1985.

TEERLINK, T.; DE KRUIJFF, B.; DEMEL, R.A. The action of pimaricin, etruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content. *Biochimica et. Biophysica. Acta*, v.599, p.484-492, 1980.

THOMASSIAN, A. Afecções da pele. In: _____. *Enfermidades dos cavalos*. 4ed. São Paulo: Varela, 2005. p. 39-41.

TRISCOTT, J.A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, v.20, p.267-271, 1993.

TUOMANEN, E. Antibiotics which kill nongrowing bacteria. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.8, p.121-122, 1987.

TÚRY, E., CORÔA, A.C. Pitiose cutânea em eqüinos no estado do Pará. In: XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1997. Gramado, RS. Anais... Porto Alegre: Sociedade de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997. p.150.

VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J.L.; STILLER, E.T. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a Streptomyces. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins. *Antibiotics Annual*, v.1955-1956, p.587-591, 1956.

VANITTANAKOM, N.; SUPABANDHU, J.; KHAMWAN, C.; PRAPARATTANAPAN, J.; THIRACH, S.; PRASERTWITAYAKIJ, N.; LOUTHRENOO, W.; CHIEWCHANVIT, S.; TANANUVAT, N. Identification of emerging human-pathogenic *Pithium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.3970-3974, 2004.

VARLAM, D.E.; SIDDIQ, M.M.; PARTON, L.A.; RÜSSMANN, H. Apoptosis contributes to amphotericin B- induced nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, p.679-685, 2001.

VERTUT-CROQUIN, A.; BOLARD, J.; CHABBERT, M.; GARY-BOBO, C. Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Biochemistry*, v.22, p.2939-2944, 1983.

WALSH, T.; FINBERG, R.W.; ARNDT, C.; HIEMENZ, J.; SCHWARTZ, C.; BODENSTEINER, D.; PAPPAS, P.; SEIBEL, N.; GREENBERG, R.N.; DUMMER, S.; SCHUSTER, M.; HOLCENBERG, J.S. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *New England Journal of Medicine*, v.340, p.764- 771, 1999.

WERNER, L.A.; HARDY, J.; BERTONE, A.L. Bone gentamicin concentration after intra-articular injection or regional intravenous perfusion in the horse. *Veterinary Surgery*, v.32, p.559-565, 2003.

WHITE, B.S.; PETERSON, R.P.; HARTSEL, S.C. Amphotericin B and nystatin show different activities on sterol free vesicles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.164, p.609-614, 1989.

WHITEHAIR, K.J.; ADAMS, S.B.; PARKER, J.E.; BLEVINS, W.E.; FESSLER, J.F. Regional limb perfusion with antibiotics in three horses. *Veterinary Surgery*, v.21, p.286-292, 1992a.

WHITEHAIR, K.J.; BLEVIS, W.E.; FESSLER, J.F.; VAN SICKLE, D.; WHITE, M.R.; BILL, R.P. Regional perfusion of the equine carpus for antibiotic delivery. *Veterinary Surgery*, v.21, p.279-285, 1992b.

WHITEHAIR, K.J.; BOWERSOCK, T.L.; BLEVIS, W.E. FESSLER, J.F.; WHITE, M.R.; VAN SICKLE, D. Regional limb perfusion for antibiotic treatment of experimentally induced septic arthritis. *Veterinary Surgery*, v.5, p.367-373, 1992c.

WHITEHAIR, K.L. Regional limb perfusion with antibiotics. In: 5th Annual Symposium of the American College of Veterinary Surgeons Symposium, 1995. Chicago, IL. *Proceedings...* Chicago: American College of Veterinary Surgeons. p. 59.

WILSON, E.; THORSON, L.; SPEERT, D.P. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.35, p.796-800, 1991.

WININGER, D.A.; FASS, R.J. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.40, p.2675-2679, 1996.

WORSTER, A.A.; LILLICH, J.D.; COX, J.H.; RUSH, B.R. Pythiosis with bone lesions in a pregnant mare. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.216, p.1795-1798, 2000.

WU, T.C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. *Clinical Infectious Diseases*, v.19, p.54-58, 1994.

YOUNG, L.Y.; HULL, C.M.; HEITMAN, J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, p.2717-2724, 2003.

ZYGMUNT, W.A. Intracellular loss of potassium in *Candida albicans* after exposure of polyene antifungal antibiotics. *Applied Microbiology*, v.14, p.953-956, 1966.

APÊNDICES

Apêndice 1. Discriminação das cidades de origem, raça, sexo, idade e peso (kg) dos equinos que foram tratados com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf) e dos equinos do grupo controle (Gc).

ANIMAL	MUNICÍPIO	RAÇA	SEXO	IDADE	PESO (kg)
Ganf 1	40 km da cidade de Poconé	Pantaneira	Fêmea	4 meses	80
Ganf 2	40 km da cidade de Poconé	Pantaneira	Macho	2 anos	250
Ganf 3	35 km da cidade de Poconé	Pantaneira	Fêmea	6 anos	250
Ganf 4	35 km da cidade de Poconé	Pantaneira	Fêmea	10 anos	300
Ganf 5	Cidade de Poconé	Pantaneira	Fêmea	5 anos	350
Ganf 6	30 km da cidade de Poconé	Pantaneira	Macho	6 anos	350
Ganf 7	Cidade de Poconé	Pantaneira	Fêmea	2 anos	250
Ganf 8	35 km da cidade de Poconé	Pantaneira	Fêmea	8 meses	100
Ganf 9	Cidade de Cuiabá	Pantaneira	Macho	5 anos	350
Ganf 10	Cidade de Cuiabá	Pantaneira	Macho	8 anos	300
Ganf 11	Cidade de Santo Antônio de Leverger	Pantaneira	Fêmea	6 meses	130
Ganf 12	Cidade de Poconé	Pantaneira	Fêmea	2 anos	250
Gc 1	Cidade de Poconé	Pantaneira	Macho	2 anos	200
Gc 2	Cidade de Várzea Grande	Pantaneira	Fêmea	11 anos	250
Gc 3	Cidade de Cuiabá	Pantaneira	Macho	8 anos	300
Gc 4	Cidade de Poconé	Pantaneira	Fêmea	14 anos	450

Apêndice 2. Discriminação da macroscopia da lesão nos dias 0, 7, 14 e 21 pós-operatórios nos equinos do grupo tratado com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf).

ANIMAL	MACROSCOPIA DA LESÃO			
	D0	D7	D14	D21
1	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo a porção dorsal e lateral das primeira e segunda falanges e linha coronária dorsal do casco do MTD. Casco com mobilidade. Animal claudicando.	Ferida rosada, com tecido de granulação não exuberante, ausência de “kunkers”. Ferida no local de administração da anfotericina B. Não apresentou aumento de volume do membro. Claudicação leve.	Ferida rosada, plana, ausência de “kunkers”. Redução do diâmetro da ferida. Não caiu o casco. Claudicação leve.	Ferida rosada, plana, diâmetro reduzido. Fase de cicatrização. Ausência de claudicação.
2	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo o centro do metacarpo do MTE. Animal claudicando.	Ferida com tecido necrótico. Sob a necrose, tecido de granulação, sem “kunkers”. Membro levemente inchado. Sem ferida no local de administração da anfotericina B. Claudicação leve.	Ferida rosada, com pouco tecido de granulação, diâmetro reduzido, ausência de “kunkers”. Membro desinchado. Ausência de claudicação.	Ferida em cicatrização. Sem “kunkers”, sem secreção, diâmetro reduzido. Ausência de claudicação.

ANIMAL	MACROSCOPIA DA LESÃO			
	D0	D7	D14	D21
3	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo a região do metacarpo e articulação metacarpo-falangeana do MTE, 360º. Animal claudicando.	Houve retração da ferida, havia pouco tecido de granulação e um local com necrose focal e “kunkers”. No local de administração da anfotericina B inchou um pouco e fez ferida exsudativa. Membro levemente inchado. Claudicação leve.	Já há sinais de epitелização, porém, há uma área mordida. Membro desinchado. Foi retirado tecido de granulação exuberante e termocauterização – algumas áreas de necrose focal, com “kunkers” (bordas distais da ferida). Foi readministrada anfotericina B por perfusão regional. Claudicação leve.	Ferida rosada, parou de coçar. Animal ganhou peso. Processo de cicatrização com ausência de “kunkers” ou tecido de granulação exuberante. Ausência de claudicação.
4	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo a região proximal do metacarpo do MTD. Animal claudicando.	Ferida com um pouco de tecido de granulação exuberante, com áreas de necrose (“kunkers”). Não observado redução de diâmetro da ferida, local de adminsitração de anfotericina B sem necrose, leve inchaço local, membro desinchado. Claudicação leve.	Remoção dos locais com tecido de granulação exuberante e termocauterização. Presença de “kunkers” infiltrados. Foi readministrada de anfotericina B por perfusão regional. Várias regiões de epitелização (borda e centro do tecido). Claudicação leve.	Ferida não melhorou. Ainda coça. Áreas de necrose com “kunkers”. Claudicação leve.

ANIMAL		MACROSCOPIA DA LESÃO			
	D0	D7	D14	D21	
5	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo a região proximal e lateral do rádio do MTD. Membro levemente aumentado de volume. Animal claudicando.	Redução do edema em torno da ferida, presença de crosta sobre a ferida, leve edema no local de administração de anfotericina B. Claudicação leve.	Ferida seca, plana, sem “kunkers”, em fase de cicatrização. Ausência de claudicação.	Ferida em fase de cicatrização, com crescimento de pele e pelos. Ausência de claudicação.	
6	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo a região medial do metacarpo do MTE, porção central. Membro aumentado de volume. Animal claudicando.	Redução do aumento de volume do membro. Ferida rosada, plana, em fase de cicatrização. Sem ferida no local de administração de anfotericina B. Claudicação leve.	Ferida em fase de cicatrização. Ausência de claudicação.	Ferida em fase de cicatrização. Ausência de claudicação.	

ANIMAL		MACROSCOPIA DA LESÃO			
	D0	D7	D14	D21	
7	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa. Aumento de volume da articulação tíbio-társica do MPE, com ferida invadindo a região dorsal desta. Animal claudicando.	Ferida com crosta, plana, em fase de cicatrização. Sem ferida no local de administração de anfotericina B. Ausência de claudicação.	Ferida em fase de cicatrização, plana, sem “kunkers”. Proprietário não fez curativo algum. Ausência de claudicação.	Ferida em fase de cicatrização. Ausência de claudicação.	
8	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo a região médio-cranial da articulação tíbio-társica esquerda. Não foi possível a remoção completa dos “kunkers” – profundo – preservação da cápsula articular. Membro aumentado de volume. Animal claudicando.	Ferida com tecido necrótico. Ainda coça. Sem ferida no local de administração de anfotericina B. Claudicação leve.	Readministração de anfotericina B, excisão cirúrgica e termocauterização. Presença de muitos “kunkers”, embora ferida não tão granulativa. Claudicação leve.	Ferida em fase de cicatrização, rosada, plana, ausência de “kunkers”. Ausência de claudicação.	

ANIMAL	MACROSCOPIA DA LESÃO			
	D0	D7	D14	D21
9	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Ferida invadindo a região de metatarso e articulação metatarso-falangeana envolvendo porção cranial, lateral e plantar. Animal claudicando. Dor no membro posterior. Emagrecimento progressivo. Aumento de volume do MPE.	Ferida granulomatosa, rosada, porção plantar sangrando e dolorida, presença de secreção viscosa em área focal na porção plantar. Aumento de volume do membro. Claudicação leve.	Ferida em fase de cicatrização, rosada, plana, foco único de pitiose (1 kunker). O restante cicatrizando. Sem lesão no local de administração de anfotericina B. Foi realizada excisão cirúrgica, termocauterização e readministração de anfotericina B por perfusão regional. Claudicação leve.	Ferida em fase de cicatrização, sem kunker, nem área necrótica. Lesão no ponto de readministração de anfotericina B. Aumento de volume do membro. Ausência de claudicação.
10	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Ferida invadindo as primeira e segunda falanges plantar e a zona coronária plantar do casco do MPE. Animal claudicando.	Ferida rosada, com tecido de granulação, ausência de "kunkers". Ferida no local de administração da anfotericina B. Membro inchou. Claudicação leve.	Redução no diâmetro da ferida, ferida rosada, plana, ausência de "kunkers", não caiu o casco. Claudicação leve.	Ferida rosada, diâmetro reduzido, ausência de secreção, em fase de cicatrização, membro desinchou. Ausência de claudicação.

ANIMAL	MACROSCOPIA DA LESÃO			
	D0	D7	D14	D21
11	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo a articulação metatarso-falangeana e as primeira e segunda falanges do MPE, toda a porção lateral, plantar e dorsal. Ferida muito infiltrada. Não foi possível remover todos os “kunkers” – exposição óssea e articular.	Ferida em cicatrização (rosada, plana, sem “kunkers”), sem aumento de volume, sem lesão e sem inchaço no local de administração de anfotericina B. Apenas presença de área focal de granulação, na região distal/lateral da ferida. Membro inchou levemente. Claudicação leve.	Ferida em fase de cicatrização, rosada, plana, exceto área distal, em que há granulação, secreção e kunker. Ferida já contraiu para cicatrizar. Sem lesão no local da aplicação. Readministração de anfoterina B por perfusão regional, após excisão cirúrgica e termocauterização. Claudicação leve.	Ferida em fase de cicatrização, plana, rosada. Já com retração cicatricial. Ausência de claudicação.
12	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de “kunkers”. Ferida invadindo a região dorsal da articulação tíbio-társica do MPD.	Ferida com crosta, plana, em fase de cicatrização. Sem ferida no local de administração de anfotericina B. Ausência de claudicação.	Ferida em fase de cicatrização, plana, sem “kunkers”. Proprietário não fez curativo algum. Ausência de claudicação.	Ferida em fase de cicatrização. Ausência de claudicação.

Legenda: MTD- membro torácico direito; MTE- membro torácico esquerdo; MPD- membro pélvico direito; MPE- membro pélvico esquerdo.

Apêndice 3. Discriminação da macroscopia da lesão nos dias 28, 35 e 60 pós-operatórios nos equinos do grupo tratado com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf).

ANIMAL	MACROSCOPIA DA LESÃO		
	D28	D35	D60
1	Ferida rosada, plana, diâmetro reduzido. Fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Ferida rosada, plana, em fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Aumento de volume discreto na região da ferida. Ausência de claudicação.
2	Ferida rosada, plana, diâmetro reduzido. Fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Ferida rosada, plana, em fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Aumento de volume discreto na região da ferida. Ausência de claudicação.
3	Ferida rosada, plana, diâmetro reduzido. Fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Ferida rosada, plana, em fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Aumento de volume discreto na região da ferida. Ausência de claudicação. Animal foi registrado no núcleo do cavalo pantaneiro.
4	Ferida não melhorou. Ainda coça.	Após 40 dias – óbito (anemia e leucocitose) – fígado repleto de “kunkers”, pulmão e linfonodos mediatínicos. Maceração da pata.	

ANIMAL		MACROSCOPIA DA LESÃO	
	D28	D35	D60
5	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Ausência de claudicação.	Ferida cicatrizada, com pelos brancos nascidos na região onde era a ferida.	Ferida cicatrizada, com pelos brancos nascidos na região onde era a ferida.
6	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Ausência de claudicação.	Ferida cicatrizada, com pelos nascidos na região onde era a ferida.	Ferida cicatrizada, com pelos nascidos na região onde era a ferida.
7	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Ausência de claudicação.	Ferida cicatrizada, com pelos nascidos na região onde era a ferida.	Ferida cicatrizada, com pelos nascidos na região onde era a ferida.
8	Ferida rosada, plana, diâmetro reduzido. Fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Redução do aumento de volume da articulação társica. Ausência de claudicação.	Pequeno tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Ausência de claudicação.
9	Ferida rosada, plana, diâmetro reduzido. Fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Ferida rosada, plana, em fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Aumento de volume discreto na região da ferida. Ausência de claudicação.
10	Ferida rosada, plana, diâmetro reduzido. Fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Redução do aumento de volume da quartela. Ausência de claudicação.	Pequeno tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Ausência de claudicação.
11	Ferida rosada, plana, diâmetro reduzido. Fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Ferida rosada, plana, em fase de epitelização e cicatrização. Ausência de claudicação.	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Aumento de volume discreto na região da ferida. Ausência de claudicação.
12	Tecido cicatricial no centro da lesão, bordas da ferida com pele e pelos. Ausência de claudicação.	Ferida cicatrizada, com pelos nascidos na região onde era a ferida.	Ferida cicatrizada, com pelos nascidos na região onde era a ferida.

Apêndice 4. Discriminação da macroscopia da lesão nos dias 0, 7, 14 e 21 pós-operatórios nos equinos do grupo controle (Gc).

ANIMAL	MACROSCOPIA DA LESÃO			
	D0	D7	D14	D21
1	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Ferida invadindo a região do metacarpo do MTD. Animal claudicando.	Ferida com algumas áreas de tecido de granulação de coloração vermelho-escuro e preta, secreção sero-hemorrágica e "kunkers". Animal claudicando.	Tecido de granulação exuberante invadindo toda a ferida, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Animal claudicando.	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Animal claudicando.
2	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Ferida invadindo a região do metacarpo do MTD. Animal claudicando.	Ferida com algumas áreas de tecido de granulação de coloração vermelho-escuro e preta, secreção sero-hemorrágica e "kunkers". Animal claudicando.	Tecido de granulação exuberante invadindo toda a ferida, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Animal claudicando.	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Animal claudicando.
3	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Ferida invadindo a região das primeira e segunda falanges do MPE. Animal claudicando.	Ferida com algumas áreas de tecido de granulação de coloração vermelho-escuro e preta, secreção sero-hemorrágica e "kunkers". Animal claudicando.	Tecido de granulação exuberante invadindo toda a ferida, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Animal claudicando.	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Animal claudicando.
4	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Ferida invadindo a região do metacarpo do MTE e MTD. Animal claudicando.	Ferida com algumas áreas de tecido de granulação de coloração vermelho-escuro e preta, secreção sero-hemorrágica e "kunkers". Animal claudicando.	Tecido de granulação exuberante invadindo toda a ferida, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Animal claudicando.	Ferida com tecido de granulação exuberante, secreção sero-hemorrágica viscosa e presença de "kunkers". Animal claudicando.

Legenda: MTD- membro torácico direito; MTE- membro torácico esquerdo; MPE- membro pélvico esquerdo.

Apêndice 5. Dados referentes à classificação da claudicação, conforme escala pré-estabelecida, nos dias 0, 7, 14 e 21 pós-operatórios, dos equinos tratados com anfotericina B, aplicada pela técnica de perfusão regional intravenosa do membro (Ganf) e dos equinos do grupo controle (Gc).

ANIMAL	D0	D7	D14	D21
Ganf 1	++	+	+	-
Ganf 2	++	+	-	-
Ganf 3	++	+	+	-
Ganf 4	++	+	+	+
Ganf 5	++	+	-	-
Ganf 6	++	+	-	-
Ganf 7	++	-	-	-
Ganf 8	++	+	+	-
Ganf 9	++	+	+	-
Ganf 10	++	+	+	-
Ganf 11	++	+	+	-
Ganf 12	++	-	-	-
Gc 1	++	++	++	++
Gc 2	++	++	++	++
Gc 3	++	++	++	++
Gc 4	++	++	++	++

Legenda: ++: claudicação severa; +: claudicação discreta; -: claudicação ausente.