

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**A PITIOSE EM EQUÍDEOS E BOVINOS NO PANTANAL  
MATOGROSSENSE**

**Carlos Eduardo Pereira dos Santos**

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Janeiro de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE  
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**A PITIOSE EM EQUÍDEOS E BOVINOS NO PANTANAL  
MATOGROSSENSE**

**Carlos Eduardo Pereira dos Santos**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Marques**

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 Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Janeiro de 2012



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


**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** A PITIOSE EM EQUÍDEOS E BOVINOS NO PANTANAL MATOGROSSENSE

**AUTOR:** CARLOS EDUARDO PEREIRA DOS SANTOS

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. JANIO MORAIS SANTURIO

Laboratório de Pesquisas Micológicas / Universidade Federal de Santa Maria

  
Profa. Dra. THAIS HELENA CONSTANTINO PATELLI

Universidade Estadual do Norte do Paraná / Bandeirantes/PR

  
Profa. Dra. SANDRA DE MORAES GIMENES BOSCO

Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu

  
Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Data da realização: 25 de janeiro de 2012.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**CARLOS EDUARDO PEREIRA DOS SANTOS** – Nascido aos onze dias do mês de maio de mil, novecentos e sessenta e seis, no município de Cuiabá – Mato Grosso, filho de Iziquias Pereira dos Santos e Maria de Lourdes Pereira, tornou-se Médico Veterinário, ao concluir em janeiro de 1990, graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Durante a vida acadêmica, realizou estágios extracurriculares e monitoria nas disciplinas de clínica-cirúrgica e fisiopatologia da reprodução animal. A seguir, iniciou suas atividades profissionais, após devida inscrição em Conselho de Classe de sua jurisdição, atuando junto as áreas de clínica-cirúrgica e fisiopatologia da reprodução de grandes animais em Hospital Veterinário privado. Em 1996-1997, cursou especialização na área de Reprodução Animal pela Universidade do Oeste Paulista e em 2001-2003, Mestrado em Saúde e Ambiente, junto ao Instituto de Saúde Coletiva pela Universidade Federal de Mato Grosso, subárea de farmacoepidemiologia. Iniciou as atividades de docência junto a essa mesma Instituição, após aprovação em teste seletivo para professor substituto nas áreas de Clínica Médica de Grandes Animais e Toxicologia Veterinária em 1997. Exerceu atividades acadêmicas como substituto pouco mais de um ano e ingressou em caráter efetivo, através de concurso público de provas e títulos, ocorrido em janeiro/1998. A partir de março/1998, ocasião da contratação, exerce cargo em atividades de ensino, pesquisa e extensão, atividades junto à esfera administrativa, no Colegiado de Curso, Departamento de Clínica Médica Veterinária e Congregação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, além de colaboração na implantação e operacionalização do Hospital Veterinário e atuação em nível de campo. Em março de 2008, iniciou a cursar doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Jaboticabal, através da formação docente do Programa Prodoutoral criado pela CAPES, no qual em contexto geral, a Instituição Federal de Ensino Superior UFMT, enquadra-se como ‘Instituição de Origem’, e a UNESP como ‘Instituição de Destino’, obtendo financiamento parcial para cumprimento das atividades oriundos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e subsídio do projeto executado, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT).

*“Insisti, persisti, venci... KPS/1966”*. Conheço a história. Reconheço o esforço. Trago essas palavras da memória da minha infância, as quais li certa vez em um telegrama e que expressam em síntese, a busca por um objetivo. Procuro assim, me espelhar. Dedico este humilde trabalho a quatro visionários, arquétipos de guerreiros (*in memoriam*), exemplos de integridade, esforço, persistência, disciplina e sabedoria. Com carinho e respeito extremo para “Seu Zeca”, “Véia Lourdes”, “Vó Júlia” e “Padro”. Vencedores. Conselheiros de enorme valor. Obrigado por me ensinar a lutar. Tenho ciência de que estou diante e preciso atravessar um rio de águas turbulentas, no limite da força, porém com reserva suficiente para continuar a caminhada na outra margem. Vamos em frente, lutando, continuarei linear, como vocês.

*“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará. Direi do SENHOR: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.”*

*Salmo 91*

Agradeço novamente à Deus e a São Benedito por estarem sempre presentes, nos momentos em que senti mais dificuldades. Foram muitas. Concordo que todas as coisas têm seu tempo, e todas passam por debaixo do céu, segundo o tempo que a cada uma delas foi prescrito. Depois do nosso nascimento no estado físico, a fonte principal de aprendizagem são os relacionamentos. Através da alegria, da dor e da emoção dos relacionamentos, avançamos em nosso caminho espiritual, de maneira a aprendermos a respeito do amor sob todas as formas. Assim, conquistamos sólidas amizades, agregamos muitas famílias. Observando e aprendendo continuamente...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos Marques. Obrigado por me receber e acatar as propostas que foram apresentadas à medida que surgiram. Tentamos primeiramente um caminho, avançamos, aprendemos e buscamos outros alternativos, igualmente importantes e vigilantes ao primeiro. Sou muito grato pela tua sinceridade e pelo indispensável auxílio na condução e desenvolvimento desse e de outros trabalhos. Agradeço pela paciência, pois tive formação essencialmente técnica. O projeto pelo caráter multidisciplinar na essência, só foi possível balizados pelos integrantes das Instituições envolvidas e ampla abertura. Tenho ainda muito a aprender e espero de fato, dar continuidade a futuros trabalhos em conjunto. Respeitosamente, permita dizer que creio que compartilhamos das mesmas dificuldades inerentes a área, que se torna cada vez mais intrigante.

Ao Prof. Dr. Janio Morais Santurio, ajuda crucial no avanço do projeto, em diversas vertentes, profissionais ou pessoais, disponibilizando teus orientandos no apoio diagnóstico e estimulando a avançar. Sabes que a atividade por aqui não é fácil. Quase que o projeto fica na intenção, mas conseguimos caminhar, dentro dos nossos limites.

Aos Professores Drs. José Jurandir Fagliari, Gervásio Henrique Bechara e Rosângela Zacarias Machado, pelo respeito e atenção que me receberam junto ao programa de pós-graduação. Tenham certeza de que são excelentes pessoas e profissionais. Éticos, dedicados. Aprendi muito com vocês.

A todo o corpo docente da UNESP, em especial aqueles dos quais me aproximei mais junto às disciplinas cursadas, tendo assim a oportunidade de conhecer melhor. Algumas se destacaram no caráter técnico. Outras agregaram além deste, o valor humano. Profs. Drs. Antonio Sergio Ferraudó, Luiz Augusto do Amaral e Paulo Henrique Franceschini, vocês são grandes Educadores.

A CAPES e FAPEMAT pelo auxílio financeiro

A todos e a todas da UNESP – profissionais do programa, professores, técnicos e amigos. Com o passar do tempo, vamos nos vinculando a diversas famílias. Particularmente trago junto a UFMS, UFMT e agora a UNESP, lembrando ainda daquelas que fizeram parte de minha formação básica, igualmente importantes.

A Sra. Nubia Josephina Lopes Brichi, por revisar com propriedade e boa vontade ímpar, as referências bibliográficas.

Aos Professores, pós-graduandos, alunos e técnicos do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), pelo constante apoio em exames complementares e trabalhos de campo, especialmente ao colega Daniel Guimarães Ubiali pela competência, atenção e dedicação aos exames histológicos.

Ao Prof. José Holanda Campelo Júnior e equipe técnica do Laboratório de Hidráulica e Climatologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMT, quanto à disponibilização dos dados climatológicos da Estação Meteorológica da Fazenda Experimental e Estação Mestre Bombled da UFMT.

Ao Brigadeiro Maurício Ribeiro Gonçalves do comando da aeronáutica CINDACTA I, bem como aos técnicos do INMET, também relativo à disponibilização de dados meteorológicos da região.

Aos membros do colegiado de Departamento e Congregação, nosso agradecimento pela liberação parcial dos encargos.

A Dra. Raquel Soares Juliano e Dr. Robson Sereno da EMBRAPA CPAP, pela sugestão do tema. Quanto trabalho rendeu aquele chopp do aeroporto...

A toda equipe do Centro de Diagnóstico Vet Vida, em especial aos Médicos Veterinários pelo auxílio no processamento e análise das amostras.

Aos Médicos Veterinários da região de Poconé e entorno, pelo auxílio da comunicação dos casos. Cabe agradecimento especial ao Dr. Joaquim Augusto Silva e Dr. Celso Figueiredo, pelo companheirismo, amizade, acompanhamento e dedicação, dividindo em nível de campo êxitos e frustrações.

A Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos Pantaneiros, em especial ao Sr. Manoel pelas informações prestadas.

Ao Sr. Aluizio – “Congo”, pela dedicação, simplicidade, respeito e interesse em auxiliar o projeto.

A minha querida, linda e indispensável família, pelo apoio e compreensão, pois novamente, em alguns períodos, por vezes longos, estive ausente para a viabilização do trabalho, mas entendam que era necessário e certamente senti muito mais do que vocês a angústia da distância. Agradeço pela força e incentivo. Os bilhetinhos surpresa da Sô, muito criativos, com desenhos e fotos assinados em conjunto por Bam e Caju, me proporcionavam enorme força para avançar. Podem fazer mais, eu gosto. Somos fortes, havendo colaboração e companheirismo.

Aos meus irmãos e agregados, minha outra querida família, de origem, primeira e singular, nas suas particularidades, por acreditar, por torcer, pelo incentivo, pelas orações e apoio enquanto estive fora.

Aos colegas do apartamento 13, em especial a Felipe *Mutum Mataca* da Silva, grande sujeito, você vai longe companheiro. Obrigado pelo apoio.

*“... ele têm de dos tipo de ferida: uma num zanga, mas é temosa. Ocê corta e ela vorta. A outra é difíci, uma tristeza. Judia do animá. Vai minguando, minguando, purgando, cria pedra no meio e vai indo até matá o bicho. Só cura se tirá o oio dela, bem no começinho”.*

Palavras do Sr. Aluízio – ‘Congo’, quando arguido se conhecia “ferida da moda” em 2007. Provavelmente estava aludindo em seu relato e típico dialeto, a respeito de sarcoide e pitiose.

Respeitar a sabedoria do povo, pantaneiro, ribeirinhos ou velhos anciões. Esse é o caminho. Antes de qualquer atitude ou intenções meramente políticas de melhorias, é preciso saber ouvir essas pessoas. Interpretá-las. Eles conhecem muito sua área e podem com propriedade avaliar perspectivas vinculadas ao progresso. Temos muito a aprender com essas pessoas simples. São observadores natos e podem também sugerir com enorme probabilidade de acerto, a melhor alternativa frente a um problema regional.

Agradecimentos aos animais. Gostaríamos que toda terapêutica fosse 100% efetiva, mas nem a vida é assim, só de glórias. Continuamos tentando melhorar isto.

25/01/2012

Recebida: 07:33:52"

Mensagem transcrita do celular:

*"Querido Pai, todos nós estamos torcendo por você, e sabemos que tudo vai dar certo, pois o Sr. se esforçou, dedicou e estudou muito para isso. Pai, você é capaz. Com amor, Júlia e Sophia."*

- Queridas filhas: conseguimos! Amo vocês.  
25/01/2012 – 14:00h

## SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	5
2.1. O Pantanal.....	5
2.2. A Pitiose.....	7
2.2.1. Histórico e taxonomia.....	7
2.2.2. O agente.....	8
2.2.3. Epidemiologia.....	9
2.2.4. Patogênese.....	11
2.2.5. Pitiose em monogástricos.....	13
2.2.5.1. Equinos.....	13
2.2.5.2. Caninos.....	15
2.2.5.3. Felinos.....	15
2.2.6. Pitiose em ruminantes.....	16
2.2.6.1. Bovinos.....	16
2.2.6.2. Ovinos.....	17
2.2.6.2. Dromedários.....	17
2.2.7. Pitiose em outras espécies.....	18
2.2.8. Pitiose em humanos.....	18
2.2.9. Pitiose experimental.....	19
2.2.10. Diagnóstico / Exames complementares.....	20
2.2.10.1 Cultura.....	20
2.2.10.2. Hematologia e bioquímica.....	21
2.2.10.3. Citologia e histopatologia.....	21

2.2.10.4. Técnicas sorológicas.....	23
2.2.10.5. Testes moleculares.....	24
2.2.11. Terapias utilizadas em pitiose.....	24
CAPÍTULO 2 - PITIOSE CUTÂNEA EM EQUINOS: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	
Resumo.....	27
Introdução.....	27
Material e métodos.....	28
Resultados e discussão.....	28
Conclusão.....	40
CAPÍTULO 3 – PITIOSE EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO NO PANTANALL MATOGROSSENSE	
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Material e métodos.....	43
Resultados.....	44
Discussão.....	50
Conclusão.....	53
CAPÍTULO 4 - EPIDEMIOLOGIA DA PITIOSE EM EQUIDEOS DE UMA SUB-REGIÃO DO PANTANAL MATOGROSSENSE E ÁREAS LÍMITROFES	
Resumo.....	54
Introdução.....	55
Material e métodos.....	56
Caracterização do estudo.....	56
Caracterização da área trabalhada.....	56
Coleta de dados.....	56
Das normais climatológicas, distribuição espacial e temporal.....	57
Da prevalência, mortalidade e letalidade.....	57
Variáveis individuais.....	57
Fatores de inclusão.....	58
Análise estatística.....	59

Resultados e discussão.....	60
Conclusões.....	74
CAPÍTULO 5 - CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PITIOSE CUTÂNEA EM EQUÍDEOS DO PANTANAL NORTE, BRASIL	
Resumo.....	75
Introdução.....	75
Material e métodos.....	76
Resultados e discussão.....	77
Conclusões.....	84
CAPÍTULO 6: EFICÁCIA DA IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DE PITIOSE FACIAL EM EQUINO	
Resumo.....	85
Introdução.....	85
Material e métodos.....	86
Resultados e discussão.....	87
Conclusão.....	92
CAPÍTULO 7: A IMUNOTERAPIA PROTEGE EQUINOS CONTRA REINFECÇÃO DO OOMICETO <i>Pythium insidiosum</i> ?	
Resumo.....	94
Introdução.....	94
Material e métodos.....	95
Resultados.....	96
Discussão.....	98
Conclusão.....	100
CAPÍTULO 8 – IMPLICAÇÕES E PERSPECTIVAS	101
REFERÊNCIAS.....	104
APÊNDICE.....	131

**LISTA DE TABELAS**

	PÁGINA
Tabela 1. Demonstrativo de dermatopatias envolvendo pitiose e outras passíveis de confundimento ou associadas, em equinos oriundos dos biomas pantanal e cerrado do estado de Mato Grosso.....	29
Tabela 2. Dados resumidos para auxílio na abordagem clínica para diagnóstico de dermatopatias em equinos.....	38
Tabela 3. Perfil epidemiológico de pitiose cutânea em animais de produção (2009-2010), em quatro propriedades rurais no município de Poconé, Pantanal Matogrossense.....	44
Tabela 4. Estudo de coorte sobre pitiose cutânea em animais de produção de quatro propriedades rurais do Pantanal Matogrossense (2009-2010).....	46
Tabela 5. Perfil epidemiológico de pitiose cutânea em equídeos (2007-2010), em propriedades rurais nos biomas Pantanal Matogrossense e Cerrado, Brasil.....	61
Tabela 6. Demonstrativo do desfecho de animais com pitiose cutânea (2007-2010), tratados ou não, oriundos de propriedades rurais nos biomas Pantanal Matogrossense e Cerrado, Brasil.....	62
Tabela 7. Variação da idade (adultos e jovens) de equinos relativa ao desenvolvimento de pitiose cutânea (2007-2010) oriundos de propriedades rurais nos biomas Pantanal Matogrossense e Cerrado, Brasil.....	65
Tabela 8. Distribuição de 76 casos de pitiose cutânea em equídeos de acordo com a idade (2007-2010) em sub-região do Pantanal Matogrossense e áreas limítrofes.....	66
Tabela 9. Demonstrativo do perfil de equídeos acometidos por pitiose cutânea e evolução em três propriedades no Pantanal Norte (2007 a 2009).....	78

Tabela 10. Demonstrativo da evolução da lesão relativo a cronologia e aspecto de úlcera decorrente de pitiose facial em uma égua, SRD, 5 anos de idade, submetida a cinco doses seriadas de imunoterapia (Pitium Vac®) pela via subcutânea em 2009, no município de Cuiabá – MT.....	88
--	----

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Pitiose cutânea, com três semanas de evolução, em membro pélvico de eqüino.....	30
Figura 2. Pitiose cutânea, com oito semanas de evolução, em membro pélvico de eqüino.....	30
Figura 3. Detalhe de membro torácico de equino acometido por pitiose cutânea. Em perneio ao tecido de granulação observam-se diversos <i>kunkers</i> (grumos branco amarelados indicados por setas), que aparecem em maior quantidade no tecido subcutâneo.....	31
Figura 4. Equinos acometido por sarcoides nas regiões peitoral (A e B) e escapular (C e D), alguns já reincidentes após exérese e cauterização com ferro candente.....	32
Figura 5. Tecido de granulação inespecífico decorrente de trauma, em membro pélvico esquerdo de equino, com aproximadamente 45 dias de evolução.....	34
Figura 6. Equino acometido por carcinoma espinocelular recoberto por extenso tecido de granulação com evolução de seis meses.....	34
Figura 7. Membro torácico de equino acometido por pitiose (A). Notar numerosos <i>kunkers</i> no subcutâneo em perneio ao tecido de granulação (setas). Em B e C, numerosos nódulos pigmentados no mesmo animal, na região facial e porção ventral da cauda.....	35
Figura 8. Animais acometidos por pitiose cutânea avançada. Observar acentuada caquexia, em animais tratados (A e B) e não tratados (C e D).....	36
Figura 9. Muares acometidos por pitiose cutânea. Em A lesão nodular, que tornou-se ulcerada, em um período de 90 dias, na região peitoral. Em B, lesão nodular fistulada na região do abdômen ventral.....	37
Figura 10. (A) Equinos distribuídos nos campos do Pantanal Matogrossense durante o período de cheia (fevereiro de 2010) com abundante vegetação aquática. (B) Equino no período de estiagem (setembro de 2009) em estação em lagoa eutrofizada.....	45

- Figura 11. Equinos e bovinos distribuídos em dois campos parcialmente alagados no final do período chuvoso (março/2009) na região de Poconé-MT. Observar aspectos comportamentais diferenciados das duas espécies, segregados, com bovinos preferindo pastar e permanecer em locais mais altos e secos (cordilheiras), contrariamente ao equino, que prefere permanecer e pastar em locais de drenagem lenta como pequenas baías ou lagoas, com membros parcialmente submersos..... 45
- Figura 12. (A) Novilha, cinco meses de idade, com lesão cutânea distal no membro pélvico, decorrente de pitiose. (B) Padrão circunscrito, superfície úmida, vermelha e brilhante em lesão recente, com menos de dez dias de evolução..... 47
- Figura 13. (A) Novilha, 12 meses de idade, com lesões distais nos membros pélvicos, decorrentes de pitiose. (B) Lesões cutâneas em diferentes graus de resolução, padrão disforme, com bordas angulares, coloração avermelhada, moderadamente ressequida, com discretos focos hemorrágicos, entre 20 e 40 dias de evolução..... 47
- Figura 14. Equino, fêmea, quatro anos de idade, com lesões multifocais decorrentes de pitiose, na extremidade distal de membros torácicos. (A) Severa emaciação do animal afetado após três meses de evolução. (B) Detalhe das lesões, com superfície úmida, tecido de granulação, *kunkers* em permeio ao tecido, distribuídos principalmente nas bordas. O quadro evoluiu para a morte, cerca de 30 dias mais tarde..... 48
- Figura 15. Média das precipitações anuais em sub-região do Pantanal Matogrossense e áreas limítrofes e distribuição temporal dos casos de pitiose cutânea em equídeos com relação aos meses do ano (2007-2010)..... 63
- Figura 16. Ao centro, sítios anatômicos de cavalos preferidos por diferentes espécies de *Tabanidae* para hematofagia, segundo Bassi et al. (2000). Observar distribuição das lesões de pitiose, apresentando correspondência com as áreas de parasitismo..... 68

- Figura 17. Sítios anatômicos de equinos acometidos por pitiose cutânea. Observar sítios de ocorrência da lesão em áreas pigmentadas ou de transição..... 69
- Figura 18. Imagens de sítios anatômicos cutâneos comumente afetados por pitiose, caracterizados por lesões de rápida expansão, correspondendo a áreas corpóreas com temperaturas mais elevadas (ilustração das imagens termográficas de Armando López Guerrero e Tatiana Figueiredo)..... 71
- Figura 19. Lesão circunscrita em equino decorrente de pitiose com 45 dias de evolução em A. Em B, mesmo animal 14 dias após primeira aplicação subcutânea do imunoterápico Pitium-Vac®. Os bordos tornam-se mais rasados com ferida mais ressequida. Em C, 14 dias após a segunda aplicação de Pitium-Vac®. Em D, mesmo equino com remissão completa após três aplicações..... 81
- Figura 20. Lesão elíptica em equino decorrente de pitiose com aproximadamente 3 meses de evolução em A. Em B após 5ª aplicação subcutânea do imunoterápico Pitium-Vac® exibindo lesão mais ressequida, porém refratária quanto a involução, desenvolvendo extenso tecido de granulação. Em C após exérese cirúrgica, seguindo mais três doses do imunoterápico. Em D o mesmo animal após resolução. Foram utilizadas oito doses a cada 14 dias..... 82
- Figura 21. Equino exibindo extensa lesão facial ulcerada decorrente de pitiose no momento da abordagem inicial (A). Nas imagens subsequentes (B-E) as tomadas foram executadas a cada 14 dias, coincidindo com aplicação de imunoterápico (Pitium Vac®), totalizando cinco aplicações. Em F, resolução da lesão com discreta cicatriz..... 89
- Figura 22. Equinos parcialmente submersos em baía com presença de plantas aquáticas, em região com elevadas temperaturas (acima de 30°C em média). Ambiente propício para presença de zoósporos de *Pythium insidiosum*..... 91
- Figura 23. (A) Hifas de *Pythium insidiosum* tipicamente marcadas pela prata. (B) Área necrótica circundada por eosinófilos na reação de Splendori-Hoeppli e imagens negativas de hifas (H&E Obj. 20X)..... 96

- Figura 24. Equino com pitiose na região da canela. Maio de 2007.  
(B) O animal foi considerado curado após cinco doses da imunoterapia..... 97
- Figura 25. (A) O mesmo equino da figura 2, apresentando lesão abdominal, em dezembro de 2009. (B) O animal foi considerado curado após quatro doses da imunoterapia..... 98

**ABREVIATURAS**

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APC	Células apresentadoras de antígenos
ASD	Ágar Saboraud Dextrose
Aw	Classificação climática de Köppen. A – clima tropical; w – verões chuvosos
CINDACTA	Centro Integrado de Defesa Aérea e Controle de Tráfego Aéreo
CIT	Convergência Intertropical
ELISA	Enzyme- Linked Immunoabsorbent Assay
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
GMS	Prata-metenamina de Grocott
HE	Hematoxilina-eosina
HOVET	Hospital Veterinário
IFN $\gamma$	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL2	Interleucina 2
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
ITS	Internal transcribed spacer
LAPEMI	Laboratório de Pesquisas Micológicas
LMV	Laboratório de Microbiologia Veterinária
LPV	Laboratório de Patologia Veterinária

mm	Milímetros
pb	Pares de base
PCR	Polymerase chain reaction
PRRN	Particular Reserve of Patrimônio Natural (Reserva Particular de Patrimônio Nacional)
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
WWF	World Wide Fund For Nature (Fundo Mundial para a Natureza)

## A PITIOSE EM EQUIDEOS E BOVINOS NO PANTANAL MATOGROSSENSE

**RESUMO** – *Pythium insidiosum* causa doença de pele e ocasionalmente de outros tecidos de mamíferos e aves que vivem em estreito contato com águas contaminadas. Pelas características bioclimáticas e ambientais da região do Pantanal, estima-se que seja uma das áreas com maior prevalência do mundo. Não obstante, certifica-se na literatura compilada poucos estudo enfatizando aspectos epidemiológicos nessa região, sendo esse o principal objetivo dessa pesquisa. As normais climatológicas foram obtidas de duas estações meteorológicas de Instituição pública, que abrange a sub-região do estudo, complementados por dados dispostos em outras fontes. Obteve-se validação de 76 casos em equideos e sete bovinos, através do ELISA-teste, PCR, histopatologia e isolamento do agente. A doença apresentou dinâmica sazonal, com picos de incidência emergindo após os maiores índices pluviométricos. Evidenciaram-se também, um número expressivo de enfermidades confundíveis, coinfeções e reinfecções, demonstrando frágil imunidade do hospedeiro equino ao patógeno. Cabe ressaltar ainda, que ferramentas de diagnóstico são pouco utilizadas a campo. Resposta significativa relativa à imunoterapia (Pitium Vac®) no grupo de equideos tratados e aumento do intervalo de reinfecções, indica que o fármaco poderá ser aperfeiçoado, de modo a agregar características profiláticas, além das terapêuticas.

**Palavras-chave:** pitiose, equinos, bovinos, *Pythium insidiosum*, epidemiologia, imunoterapia.

## THE PYTHIOSIS IN EQUIDAE AND CATTLE IN THE BRAZILIAN PANTANAL

**SUMMARY** – The disease caused by *Pythium insidiosum* affects the skin and occasionally other tissues of mammals and birds which live in close contact with contaminated water. Due to its bio-climatic and environmental characteristics, the Pantanal region is estimated to be one of the areas with higher prevalence of pythiosis in the world. However, few studies have focused on epidemiological aspects this region, the main objective of this work. Climatological normals were obtained from two meteorological stations of a public institution which covers the sub-region studied. Data from other sources were also used to complement the study. Seventy six cases of pythiosis in equidae and seven in cattle were confirmed by ELISA-test, PCR, histopathology and isolation of *Pythium insidiosum*. The disease showed seasonal dynamics with peaks of incidence emerging after the wettest pluviometric gradients. Similar diseases, co infections and reinfections were also realized, suggesting a suppression of equine immune system to *Pythium insidiosum*. It is worth mention that diagnosis tests tools available are not widely adopted in the field. Significant response on immunotherapy (Pitium Vac®) in equine treated group and increased of the intervals the reinfection, indicating that the drug could be improved by adding prophylactic and therapeutical properties.

**Key-words:** pythiosis, horses, cattle, *Pythium insidiosum*, epidemiology, immunotherapy.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pythium* Pringsheim, segundo KIRK et al. (2001), possui 127 espécies conhecidas, sapróbias em ecossistemas terrestres, aquáticos e ou em parasitas, muitas fitopatogênicas, causando danos como a podridão de frutos, raízes e caules, tombamento de mudas e podridão de sementes (“damping off”). Somente *Pythium insidiosum* destaca-se por ser patogênica para mamíferos e diversos casos da enfermidade tem sido relatados em equinos, caninos e humanos (GROOTERS, 2003; KRAJAJEUM et al., 2008; GAASTRA et al., 2010). Outras espécies, também, são acometidas e existem relatos recentes em bovinos (PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009), felinos (RAKICH et al., 2005; GROOTERS, 2003), ovinos (TABOSA et al., 2004; SANTURIO et al., 2008), aves (PESAVENTO et al., 2008) e mamíferos selvagens (CAMUS et al., 2004), sendo uma enfermidade do tecido subcutâneo e eventualmente sistêmica (VICARIVENTO et al., 2008).

A patogenicidade é variável com relação às espécies. Os bovinos mostram-se resistentes, considerando curso benigno com resolução espontânea (SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009), a despeito de ovinos (TABOSA et al., 2004) e humanos (KRAJAJEUM et al., 2008) que normalmente resultam em mortes ou disfunções, tais como ocorre em equinos, espécie mais susceptível, que da mesma forma após curso crônico, se não tratada ou tratada de forma tardia pode levar a morte (SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010).

O agente pertence ao grupo dos oomicetos, que dentre as características importantes destaca-se a produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada (SANTURIO et al., 2006a), consideradas unidades propagadoras do agente. A motilidade do zoósporo é crucial para viabilizar o contato do patógeno com o hospedeiro susceptível, podendo penetrar no seu tecido a partir de lesões prévias (RAVISHANKAR et al., 2001; PHILLIPS et al., 2008), ocorrendo a infecção quando zoósporos ou hifas

penetram em pequenos abrasões cutâneas em ambientes aquáticos contaminados (GAASTRA et al., 2010). Pesquisas acerca de oomicetos patogênicos de plantas progrediram muito nos últimos anos, contrariamente aos oomicetos patogênicos para mamíferos, que tem recebido atenção científica questionável, considerando que muitas espécies são responsáveis por doenças devastadoras em ecossistemas naturais (PHILLIPS et al., 2008), com tratamentos direcionados a plantas ou mamíferos afetados, por vezes totalmente ou parcialmente ineficazes .

A enfermidade tem distribuição cosmopolita, ocorrendo principalmente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (SANTURIO et al., 2006a), no entanto, recentemente tem sido observada em outros locais onde o clima não se enquadra nestas características, indicando que o nicho ambiental favorável ao desenvolvimento deste oomiceto está expandindo, provavelmente em consequência das mudanças ambientais, como aumento de temperatura global, associado as doenças ocupacionais, tendo em vista incidência em humanos com atividades laborais nas culturas de campos irrigados ou em aproveitamento de campos alagados para determinadas culturas (WHITE et al., 2008; GAASTRA et al., 2010). Na Tailândia, existem diversos relatos da enfermidade acometendo humanos relacionados à doença ocupacional de plantio de arroz em banhados, ocorrendo nas formas cutânea, vascular e ocular (KRAJAEJUM et al., 2006). No Brasil existe somente um relato na forma cutânea (BOSCO et al., 2005) e provavelmente existe a possibilidade de sub-notificação, devido dificuldades inerentes ao diagnóstico e associação da enfermidade com populações de baixa renda. Assim, essa enfermidade fungo-símile, vem nos últimos anos paulatinamente merecendo destaque na micologia clínica, tanto veterinária, quanto humana, não sendo objeto de estudo somente em animais, mas também, em todos os indivíduos que possam entrar em contato com o agente em ambientes alagados (SANTURIO et al., 2006a).

No Brasil a pitiose tem sido descrita em diversas espécies, porém o predomínio dos relatos engloba equinos distribuídos em diversos estados (SANTURIO et al., 2006a). Embora não existam relatos precisos da ocorrência no país principalmente enfatizando estudos epidemiológicos, os dados disponíveis indicam que a pitiose representa um problema à criação de equinos, especialmente em regiões alagadiças (LEAL et al., 2001) e

provavelmente o Pantanal brasileiro pela extensão, além de características bioclimáticas e ambientais favoráveis a proliferação e manutenção do patógeno, seja o local de maior ocorrência de pitiose equina no mundo (MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006a; SANTURIO & FERREIRO, 2008).

A principal atividade econômica do pantanal é a pecuária extensiva de corte (IBGE, 2007) e o cavalo insere-se particularmente neste contexto, pois é a base para o manejo do gado na região, incluindo-se também como importante forma de subsistência, pois pode prover renda à população pantaneira, através de comercialização direta de animais, ecoturismo, entre outras. Além disso, os equinos constituem-se por vezes, como único acesso às propriedades em determinadas épocas do ano, pelo advento da cheia. Adversidades na estação das águas e períodos de estiagem, determinam atenção questionável às práticas sanitárias. Segundo SANTOS et al. (2004), mortalidades variam em função do manejo e faixa etária. De modo geral contribuem para as perdas, o ataque de felídeos selvagens, ofídios e enfermidades diversas como a pitiose, anemia infecciosa, encefalite equina e tripanossomíases. Embora a probabilidade de existir grande número de casos distribuídos no Pantanal seja estimada, ou mesmo no próprio cerrado em regiões circunvizinhas, considerando a riqueza regional de recursos hídricos, até o momento não há nenhum estudo epidemiológico focando a dinâmica da pitiose na região, sendo este um dos principais fitos desse estudo.

Ainda, uma infinidade de protocolos terapêuticos tem sido testada para pitiose em equinos, como antimicóticos, cirúrgicos ou associação de ambos, muitos onerosos, com necessidade de monitoramento técnico constante. A velocidade de evolução da enfermidade (principal fator de insucesso da terapêutica), o difícil acesso às propriedades no período da cheia (época de maior incidência da doença), baixa renda dos usuários, são fatores que limitam a atenção a saúde nas populações de equídeos dos estratos alagáveis. Dentre os protocolos atualmente utilizados, a imunoterapia proposta inicialmente por MILLER (1981), surgiu como alternativa concreta para o controle e vem sendo aperfeiçoada sob diferentes técnicas de processamentos com resultados promissores (MONTEIRO, 1999; MENDOZA et al., 2003; SANTURIO et al., 2003a). Assim, considerando as características peculiares da região (limitação a aporte técnico, ausência

de infra-estrutura básica), associadas às características do imunoterápico, desenvolvido pelo LAPEMI/EMBRAPA (conservação em temperatura ambiente, facilidade de aplicação, reações adversas mínimas, custo acessível), procurou-se como objetivo adicional, avaliar a eficácia da imunoterapia, como alternativa de tratamento a campo, estudo pioneiro da região, quanto a essa modalidade terapêutica.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. O Pantanal**

O Pantanal brasileiro situado na região Centro-Oeste do Brasil, na Bacia Hidrográfica do Alto Paraguai, é conhecido como a maior área úmida do planeta, definido como uma planície contínua de inundação, com diversidade biológica, de ambientes e paisagens (WWF - Brasil 2004), albergando vegetação característica de quatro grandes biomas como Mata-Atlântica, Cerrados, Floresta Amazônica e Chaco, com ampla concentração de fauna das Américas (WADE et al., 1994).

Para fins de delimitação, segundo SILVA & ABDON (1998) pode ser definido como toda área contígua inserida na Bacia do Alto Paraguai, sujeitas a inundações periódicas inter e intra-anuais. Nesta, ocorrem fisionomias diferenciadas, em função das regiões e rios tributários da imensa planície alagável, possibilitando sua divisão em sub-regiões ou subunidades morfológicas, denominadas por estudiosos como pantanais, cuja adjetivação, varia de acordo com a região onde estão situados (NEVES et al., 2009).

A planície pantaneira inclina-se suavemente na direção leste-oeste e menor ainda na direção norte-sul, contribuindo para o lento escoamento das águas, sendo a drenagem constituída por pequenos cursos de água (córregos), por linhas de drenagem sem canal bem desenvolvidos (vazantes), por córregos temporários (corixos), por lagos e lagoas (baías) e por meandros abandonados (CARVALHO, 1986).

O clima do Pantanal Matogrossense está relacionado com os fatores climáticos da bacia do Alto Paraguai e com fatores orográficos que influenciam os movimentos de massa de ar (GARCIA, 1984). O Centro-Oeste brasileiro tem clima caracterizado por invernos secos e verões chuvosos, sendo que o período de chuva está associado ao deslocamento para Sul da Zona de Convergência Intertropical (CIT). Em função da influência da massa de ar tropical marítima e equatorial, as temperaturas são elevadas durante todo o ano e quando a CIT está deslocada para o Norte, no inverno, a região apresenta baixa ou nenhuma precipitação (HARSENACK et al., 2003).

As medidas meteorológicas e a análise das mesmas revestem-se de especial importância na pesquisa agropecuária, que negligenciadas, dificulta planejar e interpretar a pesquisa, uma vez que não se podem definir relações entre o clima e os resultados biológicos aplicáveis a pesquisa (GARCIA, 1984). No Norte, as estações são mais definidas que na parte Central e Sul (GARCIA, 1984; MORAES et al., 2001), sendo que com base nas análises de séries pluviométricas de setenta anos, se estimou que acima de 80% da chuva média anual, em torno de 1200mm, se concentra no período de outubro a março (GARCIA, 1984). A estação chuvosa, denominada de “verão”, concentra 80% do total anual das chuvas e a seca (abril a setembro) os 20% restantes, sendo denominadas de “inverno”. O clima é tropical, quente e úmido, do tipo Aw segundo classificação de Köppen, a temperatura média anual é de 25,5°C, com média das mínimas de 20°C no “inverno” e de 32°C nos meses de verão (MORAES et al., 2001).

Segundo SOARES et al. (2006), a litologia da região ocorre sob as formas argilosa e arenosa, de modo alternado e descontínuo. Dentre as unidades fitofisionômicas, o Campo inundável é a maior área de ocorrência, seguido pelas Cordilheiras, Landizal e Cambarazal, respectivamente, com distribuições distintas e influenciadas pela intensidade e duração da inundação, condicionando o espectro biológico da vegetação, que pelo estresse hídrico e falta de oxigênio, favorece a espécies mais adaptadas a longos períodos de alagamento (FANTIN-CRUZ et al., 2010).

De acordo com imagens térmicas obtidas por satélites, verifica-se que áreas de temperaturas mais amenas associam-se a cambarazais e a mata densa ao passo que temperaturas mais quentes, 32°C em média, relacionam-se a campos e áreas abertas, com variações de oito a 21°C (HARSENACK et al., 2003).

A tríade de solo inundável com drenagem lenta, abundância de vegetação aquática e altas temperaturas ambientais, são condições bioclimáticas e ambientais propícias a proliferação, propagação e manutenção do agente *P. insidiosum*, patógeno fungo-símile de mamíferos e aves.

## 2.2. A Pitiose

### 2.2.1. Histórico e taxonomia

Os primeiros casos relatados envolvendo equinos com pitiose foram descritos por veterinários ingleses na Índia estudando granulomas cutâneos, com infecção aparentemente fúngica (SMITH, 1884; FISH, 1895; DROUIN, 1896 apud MENDOZA, 1996). O primeiro isolamento foi realizado por DE HAAN & HOOGKAMER em 1901 na Indonésia e propuseram a denominação de *Hyphomyces destruens*, porém sem êxito na classificação, que foi feita a partir das características morfológicas das hifas e sendo enquadrado como zigomiceto ou ficomiceto (SANTURIO & FERREIRO, 2008; GAASTRA et al., 2010). Em 1924, no segundo isolamento descrito, J. WITKAMP isolou micro-organismo similar a DE HAAN & HOOGKAMER, e compilou diversos aspectos clínicos e patológicos da doença (MENDOZA et al., 1996). No início do século 20, verificou-se em achados contemporâneos, que granulomas equinos poderiam ser causados por nematóides do gênero *Habronema*. Assim, relatos daquela época, foram mascarados pela nova hipótese, nos quais se utilizou indiscriminadamente o termo 'habronemose cutânea equina' tendo como consequência, o desuso e esquecimento da provável etiologia fúngica, que fora retomada algo em torno de trinta e sete anos depois (MENDOZA et al., 1996). Então, BRIDGES & EMMONS (1961), pela terceira vez, isolaram e identificaram o agente, e pensando tratar-se de um zigomiceto, provavelmente *Mortierella* chamaram a doença de ficomicose, termo usado para designar micoses causadas por fungos com hifas grandes e poucos septos (MENDOZA, 1996; SANTURIO & FERREIRO, 2008; GAASTRA et al., 2010). Em 1974, após isolamento e observação quanto a capacidade do agente produzir zoósporos biflagelados AUSTICK & COPLAND, classificaram o *H. destruens* como um fungo da família *Pythiaceae*, ordem Peronosporales, que deveria ser incluído no gênero *Pythium*, muito embora as descrições anteriores tenham sido utilizadas até o final da década de 70 (SANTURIO & FERREIRO, 2008). Analisando isolados de mamíferos oriundos de diversos locais, DE COCK et al. (1987) concluíram que se tratava do mesmo

organismo, sendo que a nova espécie era igual as anteriormente descritas e foi denominado como *Pythium insidiosum* (MENDOZA & MARIN, 1989; SANTURIO & FERREIRO, 2008; GAASTRA et al., 2010).

Embora o nome do agente tenha sido estabelecido, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes (LEAL et al., 2001). DICK (2001) afirma que *Pythium insidiosum* pertence ao reino *Straminipila*, classe *Peronosporomycetes* (=oomycetes), ordem *Pythiales* e família *Pythiaceae*. Entretanto, a classificação é controversa e ainda há divergências entre pesquisadores (PEREIRA & MEIRELES, 2007). Assim sendo, mudanças futuras poderão ocorrer com o advento de novas ferramentas de diagnóstico tais como biologia molecular e sequência de DNA (GAASTRA et al., 2010), determinando possíveis reclassificações como subespécies face a diferença entre isolados estudados de distintas regiões geográficas (SCHURKO et al., 2003; SANTURIO & FERREIRO, 2008). Estudos taxonômicos mais aprofundados demonstraram que a classe Oomycetes são filogeneticamente distantes dos membros do Reino Fungi, com característica mais próxima a algas que a fungos, principalmente relacionados a diferenças na parede e composição da membrana celular, sendo que nenhum dos oomicetos compartilha da mesma bioquímica dos esteróides como fungos (GROOTERS et al., 2003; SANTURIO et al., 2006a).

### **2.2.2. O agente**

Os oomicetos caracterizam-se por produção de zoósporos biflagelados durante reprodução assexuada, reprodução sexuada oogâmica, parede celular composta de beta-glucanas, celulose e hidroxiprolina, talo diplóide, síntese do aminoácido lisina alternativa (MENDOZA et al., 1996; ALEXOPOULOS et al., 1996 apud SANTURIO & FERREIRO, 2008). É um micro-organismo fungo-símile essencialmente aquático (PEREIRA & MEIRELES, 2007; PHILIPS et al., 2008) que se reproduz assexuadamente através de zoósporos biflagelados, os quais são considerados propagadores do agente e liberados periodicamente em águas pantanosas, demonstrando quimiotaxia por pêlos e tecidos lesionados de plantas ou animais, com posterior adesão devido a uma

glicoproteína secretada na superfície do zoósporo encistado (MILLER, 1983; MENDOZA et al., 1993; GAASTRA et al., 2010). Zoósporos não podem se dividir ou multiplicar (WALKER & VAN WEST, 2007) e somente desenvolvem-se em culturas úmidas estimulados pela presença de íons como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (MENDOZA et al., 1993). A temperatura ótima para crescimento situa-se entre 34-36°C (DE COCK et al., 1987), estando bem adaptado a temperatura do hospedeiro mamífero (GAASTRA et al., 2010). A presença de abrasões cutâneas permite a adesão e germinação dos zoósporos (RAVISHANKAR et al., 2001; QUINN et al., 2005; PEREIRA & MEIRELES, 2007), que por sua vez, incrementado por temperaturas de 37°C, secretam enzimas que facilitam a penetração e difusão nos tecidos íntegros de hospedeiros infectados (RAVISHANKAR et al., 2001; MACDONALD et al., 2002).

### **2.2.3. Epidemiologia**

A pitiose é uma enfermidade distribuída mundialmente, de ocorrência mais frequente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, normalmente relacionadas a solos e ambientes úmidos (MENDOZA et al., 1996; POOLE & BRASHIER, 2003). As localizações das lesões estão diretamente relacionadas às partes do corpo em contato direto com águas contaminadas por zoósporos de *P. insidiosum*, determinados pelo marcante tropismo por lesões cutâneas, intestinais e pêlos (DE COCK et al., 1987; MENDOZA et al., 1993; GAASTRA et al., 2010). Lesões decorrentes de picadas de insetos podem ser importante porta de entrada (MENDOZA et al., 1993; REES, 2004) e devem ser consideradas como importante ponto epidemiológico (SCHURKO et al., 2003) uma vez que já se isolou o agente em larva de mosquito na Índia. O fato sugere que o oomiceto pode ter habilidade de infectar vetores, especialmente em regiões tropicais, onde mosquitos têm alta prevalência (GAASTRA et al., 2010). Não há predisposição por sexo, idade e raça e a fonte de infecção são zoósporos ambientais (MENDOZA & ALFARO, 1986; FOIL, 1996; SANTURIO et al., 2006a, GAASTRA et al., 2010). Até o momento, não foram demonstradas características zoonóticas para *P. insidiosum*, e não há relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e

homem. Ainda, a doença não é reproduzida experimentalmente no hospedeiro natural (MENDOZA et al., 1998; GAASTRA et al., 2010). Pitiose tem sido relatada na Austrália, Brasil, Burma, Colômbia, Costa Rica, Indonésia, Japão, Nova Guiné, Tailândia e Estados Unidos (GAASTRA et al., 2010). A enfermidade recebe diversas denominações, sendo conhecida como “leeches” nos Estados Unidos, “swamp cancer” na Austrália, “hyphomycosis destruens equi” na Indonésia, “espúndia equina” na Colômbia e Costa Rica, “dermatite granular” no Japão, Hifomicose, zigomicose, “bursatte” na Índia, sanguessuga dos cavalos da Flórida (LUVIZARI et al., 2002; SANTURIO et al., 2006a; PEREIRA & MEIRELES, 2007). O termo hifomicose ou zigomicose erroneamente inclui outras enfermidades de etiologias fúngicas distintas como a basidiobolomicose, conidiobolomicose e as mucormicoses, da ordem *Entomophthorales* e *Mucorales* respectivamente (BROWN & ROBERTS, 1988; PEREIRA & MEIRELES, 2007). O termo “bursatte”, deriva de ‘bururs’ ou ‘bursat’ como é conhecida na Índia, que significa ferida da chuva (MENDOZA et al., 1996). No Brasil, a terminologia pode variar de acordo com o dialeto da região, sendo conhecida no Rio de Janeiro como “formigueiro” (REIS JR, 2000). Na Paraíba, relativa à forma rinofacial em ovinos, é conhecida como “focinho de touro” (RIET-CORREA et al., 2008). Em Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, é conhecida popularmente por “ferida da moda” ou “ferida brava” e muitas vezes, tratada de forma errônea como habronemose, dada a semelhança macroscópica entre essas enfermidades (LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a).

Na Austrália, a pitiose é usualmente observada no final do verão, depois da formação de campos alagados remanescente de chuvas e altas temperaturas sazonais (MILLER & CAMPBELL, 1982; MENDOZA et al., 1996, LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a), o mesmo ocorrendo no Brasil, emergindo durante ou após estação chuvosa e em todas as regiões (PEREIRA & MEIRELES, 2007; SANTURIO & FERREIRO, 2008). Para a produção de zoósporos móveis, forma infectante do agente, segundo MILLER & CAMPBELL (1982), são requeridas temperaturas entre 30 e 40°C e acúmulo de água em banhados e lagoas. No Pantanal Sul brasileiro, a maioria dos casos é registrada entre os meses de fevereiro e maio, correspondendo ao ápice da estação

das águas, enquanto que na Paraíba, os registros distribuem-se entre julho e outubro, ocorrendo nessa região, de sete a dez meses após o início das chuvas (TABOSA et al., 1999; SANTURIO et al., 2006a). Segundo MENDOZA (1996) o Pantanal brasileiro pode ter a maior incidência e prevalência da pitiose equina do mundo, pela extensa planície inundável e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. O oomiceto encontra-se largamente distribuído na natureza, particularmente em áreas pantanosas alagadiças compostas por águas com valores de pH próximos a neutralidade (SILVEIRA et al., 2010).

O ciclo inicia-se quando uma planta é colonizada e ocorre a diferenciação do esporângio, que após a maturação liberam zoósporos (MENDOZA et al., 1993). Os zoósporos são móveis, biflagelados e desempenham papel de propagadores do agente, nadando em direção a outra planta para iniciar um novo ciclo. Existe um quimiotactismo tanto relacionado à planta, quanto relacionado ao pêlo do animal (MILLER, 1983; MENDOZA et al., 1993; MENDOZA et al., 1996; PEREIRA & MEIRELES, 2007). Se um animal ou humano entra neste ecossistema, os zoósporos podem ser atraídos para tecidos lesados, aderindo-se através de uma substância amorfa secretada que após fixação, permite a formação de filamentos com poder invasivo e causando pitiose no hospedeiro (MENDOZA et al., 1993; CHAFFIN et al., 1995; MENDOZA et al., 1996).

#### **2.2.4. Patogênese**

A patogênese não está bem definida em parte devido a reprodução experimental ser obtida apenas em coelhos (MENDOZA et al., 1996) e até o momento não foi possível reproduzir em equinos, não obstante ser a espécie mais afetada, ou em qualquer outro animal (SANTURIO & FERREIRO, 2008; GAASTRA et al., 2010). Hifas de *Pythium insidiosum* não exercem pressão suficiente para penetrar em pele intacta e provavelmente, segundo RAVISHANKAR et al. (2001), prévias lesões macro ou microscópicas são necessárias para desenvolver infecção nos animais. Há controvérsias relativas a isto, pois embora animais possam ser contaminados a partir de pequena lesão cutânea, existe também a possibilidade de penetração através de

folículos pilosos, uma vez que se detectou hifas no interior dos mesmos de bovinos infectados (SANTURIO et al., 1998). Ainda, para exercer força de penetração em tecidos íntegros, o oomiceto utiliza enzimas que para serem produzidas, requerem temperaturas de 37°C. Essa premissa é condição indispensável para que ocorram ativação e produção enzimática (RAVISHANKAR et al., 2001). Os zoósporos encistados estimulados pela temperatura corporal do hospedeiro desenvolvem um tubo germinativo (hifa) que se estendem dos mesmos, penetrando mecanicamente nos tecidos do hospedeiro ou invadindo vasos sanguíneos (em humanos). A doença progride rapidamente, se não tratada nos estágios iniciais colocando em risco a vida dos hospedeiros. Em humanos com comprometimento vascular, os índices de óbito chegam a 47% e em animais não tratados, ou abordados de forma tardia, predomina o desfecho fatal ou disfunção (REIS JR & NOGUEIRA, 2002). Após penetração nos tecidos, ocorre liberação de exoantígenos que atraem as células apresentadoras de antígenos (APC). Os APC liberam IL4 que estimula a atração dos linfócitos T auxiliar, que por sua vez estimulam linfócitos Th2, os quais induzem a produção de mais IL4 e IL5. As IL4 estimulam células B para produção de IgE, IgM e IgG que são detectadas por testes sorológicos. As IL5 e IgE desencadeiam a mobilização de eosinófilos e mastócitos para o sítio lesional, que degranulam sobre as hifas, provocando o fenômeno de Splendore-Hoeppli. Os restos necróticos acumulados darão origem aos *kunkers*, material branco amarelado semelhante a corais, que se formam somente na espécie equina. No interior dos *kunkers*, existe uma grande produção de exoantígenos, evento que bloqueia a resposta imune em Th2 (MENDOZA et al., 2003), mecanismo de evasão do *Pythium insidiosum* relativo ao sistema imune do hospedeiro equino. Acredita-se que a grande e constante liberação de mediadores inflamatórios em caráter crônico, como fator de necrose tumoral, seja responsável pela doença debilitante crônica característica que os animais expressam (LEAL et al., 2001), além da crônica perda de sangue e íons devido ao caráter secretório das extensas lesões ulceradas (MILLER, 1983; ALFARO & MENDOZA, 1990; LEAL et al., 2001). Ainda, enfermidades granulomatosas crônicas com etiologia fúngica de modo geral, determinam anemia e hipoproteinemia (DIAL, 2007).

Massas que podem se desenvolver no abdômen, geralmente cursam com caráter obstrutivo, determinando grave síndrome cólica (BEZERRA JÚNIOR et al., 2010). Envolvimentos ósseos se relacionam com enfermidade de curso clínico crônico (ALFARO & MENDOZA, 1990; HEADLEY & ARRUDA JÚNIOR, 2004; FREY JR et al., 2007), que normalmente são refratários a terapia variada e geralmente culminam com óbito.

## **2.2.5. Pitiose em monogástricos**

### **2.2.5.1. Pitiose em equinos**

Nesta espécie, a mais atingida, as lesões cutâneas são mais prevalentes que lesões intestinais ou ósseas. O prurido é um sinal comum, podendo ocorrer por contaminação secundária dos sítios lesionais, ou mesmo pela ativação e degranulação de mastócitos, eosinófilos, macrófagos e outras células inflamatórias, envolvidas nos danos teciduais, sendo o prurido e automutilação consequência a esses eventos (GAASTRA et al., 2010). Contaminação e necrose tecidual determinam forte odor no tecido afetado (BUBBERMAN, 1914 apud GAASTRA et al., 2010). As lesões cutâneas são normalmente de caráter único (SANTURIO & FERREIRO, 2008), embora sejam frequentes lesões múltiplas (MILLER & CAMPBELL, 1982; MENDOZA & ALFARO, 1986), evoluindo rapidamente, com ulceração, e formação de extenso tecido de granulação, frequentemente secretórias (SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). São comuns formação de tecido necrótico, composto por hifas, eosinófilos degranulados e outras células inflamatórias, que se agregam e formam estruturas semelhantes a corais, de coloração cinza-amarelada, com tamanhos variando entre dois e 20 mm, reconhecidas internacionalmente como *kunkers* (SANTURIO et al., 2006a) e verificadas somente na espécie equina. Essas estruturas a medida que vão sendo formadas, são expelidas através dos *sinus* em perimeio a lesão de forma espontânea ou após sofrerem determinada pressão na área afetada (MILLER, 1983;

LEAL et al., 2001, MENDOZA & NEWTON, 2005; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010).

Os sinais clínicos de cavalos afetados variam conforme grau e localização da lesão e podem ser verificadas claudicações, edema perilesionais, laminites e por vezes infartamento de gânglios regionais, fato que não necessariamente significa metástase (MILLER & CAMPBELL, 1984; SANTURIO et al., 2006a). Embora mais raro, pode existir lesões ósseas (osteólise ou osteomielites) ou disseminação para outros órgãos, em continuidade a lesões cutâneas de caráter crônico (GOAD, 1984; MENDOZA et al., 1988; ALFARO & MENDOZA, 1990; REIS et al., 2003; HEADLEY & ARRUDA JÚNIOR, 2004) os quais, conforme mencionado anteriormente, normalmente determinam prognóstico desfavorável (FREY JR et al., 2007). A caquexia progressiva que animais afetados apresentam é um sinal frequente e muito relatado, associado à pitiose subaguda ou crônica a despeito da manutenção do apetite (MILLER, 1983; ALFARO & MENDOZA, 1990; LEAL et al. 2001).

Por vezes a enfermidade cursa com quadros de abdômen agudo, devido o caráter obstrutivo consequentes ao desenvolvimento de massas intraluminais de localização gastroentéricas, sendo normalmente diagnosticadas em necropsias ou verificadas em transoperatórios (SANTURIO et al., 2003b; BEZERRA JÚNIOR et al., 2010). O envolvimento intestinal em equinos segundo SANTURIO et al. (2006a), é considerado a segunda forma mais frequente da infecção pelo *Pythium insidiosum*.

No Pantanal brasileiro, foram relatadas formas atípicas da enfermidade, nas quais as lesões adquiriram um caráter quiescente, sem secreção constante e os animais não exibiam caquexia progressiva. Esse perfil verificado com curso clínico acima de um ano, sem alteração significativa sob o escore corporal e tão pouco relativo ao aspecto e tamanho da lesão, ainda não foi descrito em outro local, sendo verificados somente nessa região (LEAL et al. 2001).

### **2.2.5.2. Pitiose em caninos**

Em cães, segunda espécie mais atingida (SANTURIO et al., 2006a) a doença envolve trato gastrointestinal e pele, sendo relatada frequentemente em cães jovens, especialmente da raça Labrador, em contato com ambientes alagados como lagoas ou pântanos (MILLER, 1985; FISHER et al., 1994; GROOTERS, 2003; BERRYESSA et al., 2008). Lesões no estômago (RODRIGUES et al., 2006) são mais comuns que em intestino delgado (BRELLOU et al., 2006). Em menor escala o trato digestivo superior, na região do esôfago e circunjacentes, podem ser atingidas (PATTON et al., 1996; HELMAN & OLIVER, 1999). A enfermidade é de caráter consuntivo crônico e normalmente verificam-se massas abdominais palpáveis, ocasionalmente envolvendo mesentério e linfonodos regionais, caracterizadas por inflamação granulomatosa e presença de hifas intralésionais (TROST et al., 2009), cabendo atenção no diagnóstico diferencial de doenças debilitantes crônicas, principalmente em cães jovens oriundos de propriedades rurais (MILLER, 1985). Ressalte-se que casos de lesão cutânea crônica ulcerativa com localização lombar foram relatados, em sítios corpóreos onde comumente ocorre dermatite alérgica a pulgas (RIVIERRE et al., 2005). Já se relatou também afecção prostática (JAEGER et al., 2002) devendo portanto, serem consideradas no diagnóstico diferencial com enfermidades mais comuns na casuística ambulatorial e passíveis de confundimento, além de patologias provocadas por outros oomicetos patogênicos (GROOTERS, 2003).

### **2.2.5.3. Pitiose em felinos**

Em gatos, segundo SANTURIO et al. (2006a), é considerada rara, havendo poucos relatos na literatura. Alguns casos descritos estavam relacionados a obstrução intestinal e foram resolvidos por ampla ressecção cirúrgica (RAKICH et al., 2005). Há relatos de infecção nasal e retrobulbar, sem envolvimento de órgãos internos (BISSONNETTE et al., 1991 apud SANTURIO & FERREIRO, 2008).

## 2.2.6. Pitiose em ruminantes

### 2.2.6.1. Pitiose em bovinos

Até pouco tempo considerada de baixa frequência, os primeiros relatos datam da década de 80 na região de Louisiana (MILLER et al., 1985) e 90 na região do Pantanal em Mato Grosso do Sul (SANTURIO et al., 1998). Os relatos descrevem lesões cutâneas em regiões apendiculares de bezerros, sendo que no primeiro houve relato de óbito ao passo que no segundo mencionou-se cura espontânea das lesões. Novos relatos surgiram então a partir de 2005, nos quais se descreveu a enfermidade em forma de surtos na Venezuela (PÉREZ et al., 2005), e na região Sul do Brasil (GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009). Cura espontânea foi predominantemente observada em bovinos jovens. As lesões envolviam injúrias cutâneas localizadas na porção distal de membros, ulceradas, com edema perilesional e claudicações, relacionando-se epidemiologicamente ao contato dos animais com águas contaminadas por zoósporos. Somente nos primeiros relatos foi possível o isolamento do agente, segmento ao que parece, bastante difícil de obter êxito, sendo a confirmação dos casos baseados em métodos sorológicos e moleculares. PÉREZ et al. (2005) chamam atenção para a probabilidade de outras ocorrências em regiões endêmicas de clima tropical com impacto econômico ainda desconhecido, podendo, pela similaridade macroscópica, alguns casos de pododermatite atribuídos a bactérias anaeróbicas, serem provocados por *Pythium insidiosum*. Regressão das lesões em períodos de tempo relativamente curto pode dificultar o diagnóstico, sugerindo que a enfermidade possa ser mais frequente, porém não diagnosticadas, nas áreas de risco (GRECCO et al., 2009). Nesta espécie não há formação de *kunkers* (SANTURIO & FERREIRO, 2008).

### 2.2.6.2. Pitiose em ovinos

A primeira descrição ocorreu em 2004, em rebanhos da região Nordeste do Brasil sob a forma de surtos e um caso foi relatado na região de Mato Grosso (TABOSA et al., 2004; SANTURIO et al., 2008). Em todas as situações os animais apresentaram curso clínico fatal. Ocorre durante ou final do período chuvoso, podendo surgir surtos na época seca, porém relacionados a permanência de animais dentro ou ao redor de açudes para pastoreio, face a escassez de forragens (TABOSA et al., 2004; RIET-CORREA et al., 2008; SANTURIO et al., 2008). A manifestação clínica apresenta-se sob duas formas: a primeira, tal como ocorre nos equinos, caracterizadas por lesões ulcerativas cutâneas distribuídas nos membros, porções ventrais do abdômen e escápula, ressequida ou úmida, com superfície de coloração avermelhada, ou marrom escura (TABOSA et al., 2004) sem *kunkers*. A segunda, sob a forma rinofacial (RIET-CORREA et al., 2008; SANTURIO et al., 2008). A evolução, de acordo com TABOSA et al. (2004), resulta invariavelmente em óbito em animais não tratados. Recentes trabalhos apontam evidências que terapias a base de iodeto de potássio podem dar resultados satisfatórios nessa espécie, principalmente se utilizados no início da enfermidade (PEREIRA & MEIRELES, 2007; SOUZA et al., 2010). A alta prevalência da doença em rebanhos de ovinos, em condições ecológicas favoráveis a multiplicação e transmissão do patógeno, aliados a ocorrência de metástases em linfonodos regionais, pulmões e tendão, com elevados índices de óbitos nos animais não tratados, sugere que a espécie é altamente susceptível a pitiose (TABOSA et al., 2004). Vale ressaltar que em alguns casos, existem lesões muito semelhantes macroscopicamente, podendo inclusive existir coinfeções, com zigomicetos, mais especificamente conidiobolomicose (RIET-CORREA et al., 2008).

### 2.2.6.3. Pitiose em dromedários

Existe relato em dromedário (*Camelus dromedarius*) que apresentou lesão facial e submetido a tratamento associando imunoterapia, iodo e ceftiofur, porém evoluindo

para óbito precedido de caquexia progressiva em um período de seis meses, sendo observadas hifas no omaso (WELLEHAN et al., 2004). Em recente trabalho, VIDELA et al. (2011) relatam o desenvolvimento de extensa massa vulvar em dois outros dromedários, dos quais um deles evoluiu para êxito letal, apesar do protocolo clínico-cirúrgico.

### **2.2.7. Pitiose em outras espécies**

Relatos de pitiose em outras espécies predominam nos animais criados em cativeiro. Nesses ambientes, os animais estão ativamente sob vigilância, facilitando dessa forma o diagnóstico, se comparados aos de vida livre. Grandes felídeos selvagens podem ser acometidos e existe descrição em *Panthera onca* na América Central e *Panthera tigris tigris* na Flórida. No primeiro houve acometimento primário pulmonar, enquanto que o segundo se verificou desenvolvimento de lesão abdominal, ambos cursando para êxito letal (CAMUS et al., 2004; BUERGELT et al., 2006). GAASTRA et al. (2010) relata que *P. insidiosum* foi isolado de tecidos de ursos (*Tremarctos ornatus*) acometidos de lesões cutâneas e trato gastrointestinal em zoológico de Colúmbia na Carolina do Sul. Existe também uma descrição acerca de acometimento cutâneo de cegonha (*Plegadis chihi*) oriunda de região alagável na Califórnia (PESAVENTO et al., 2008).

### **2.2.8. Pitiose em humanos**

A maioria dos casos de pitiose humana foi diagnosticada na Tailândia e em menor escala nos EUA, Austrália, Haiti e Nova Zelândia, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade (KRAJAEJUM et al., 2006; SANTURIO et al. 2006a). Os casos afetam indivíduos aparentemente saudáveis, sendo a totalidade relativa ao contato ou permanência de hospedeiros infectados com águas contaminadas por zoósporos, seja por condição ocupacional ou lazer (GAASTRA et al., 2010). Os diagnósticos foram relatados na década de 80 e as lesões apresentam-se sob a forma subcutânea,

vascular - com trombose e gangrena, além da sistêmica, atingindo a extremidade de pacientes talassêmicos e ceratite, associada ou não a talassemia. Pacientes acometidos são predominantemente do sexo masculino, entre 20 e 60 anos, com atividades nas áreas rurais, como plantio de arroz em banhados ou piscicultura (SANTURIO et al., 2006a; KRAJAEJUM et al., 2008). Subnotificação é provável, pois a pitiose pode ser confundida com outras infecções fúngicas. Na Austrália e USA crianças são mais susceptíveis a forma ocular, enquanto que adultos desenvolvem mais a forma subcutânea (MENDOZA et al., 2003). A grande associação da pitiose com pacientes portadores de enfermidades hemolíticas, considerando o predomínio de relatos em pacientes com esse perfil, sugere que a hemólise pode de alguma forma incrementar a susceptibilidade dos hospedeiros humanos ao oomiceto (KRAJAEJUM et al., 2008). Até o momento, há um único caso descrito no Brasil com manifestação cutânea (BOSCO et al., 2005).

#### **2.2.9. Pitiose experimental**

Foi comprovada a susceptibilidade em coelhos pela inoculação subcutânea ou intraperitoneal com solução rica em zoósporos. A espécie é a única utilizada como modelo experimental, pela impossibilidade de reprodução em qualquer outro hospedeiro (MILLER & CAMPBELL, 1983; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). A primeira via citada determina formação de granuloma progressivo, porém sem ulceração, enquanto que na segunda, os animais desenvolvem hepatite severa e peritonite, com área de necrose contendo hifas (SANTURIO et al., 2006a). Interessante relatar que a susceptibilidade de coelhos a infecção experimental foi relatada 100 anos atrás por WITIKAMP (1924, 1925) de acordo com a revisão de GAASTRA et al. (2010), e tem sido usada até o momento, para testes de agentes imunoterápicos e antimicóticos, ainda que a síndrome clínica desenvolvida, difere em parte do hospedeiro equino.

### **2.2.10. Diagnóstico / Exames complementares**

Considerando ampla variedade de doenças fúngicas, passíveis de confundimento, pelo desenvolvimento de síndromes clínicas similares ou relativas a outras doenças, existem muitos limites para diagnóstico preciso da etiologia (DIAL, 2007). Tradicionalmente, o diagnóstico é embasado nos aspectos clínicos, histopatológicos, isolamento e identificação do agente através de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas, metodologia que dificulta a identificação precoce, um dos principais quesitos para o sucesso terapêutico (SANTURIO et al., 2006a,b; KRAJAEJUM et al., 2008; GAASTRA et al. 2010). Existem inúmeras entidades nosológicas similares, as quais demandam atenção ao diagnóstico diferencial e de modo geral, exemplificam-se a habronemose, neoplasias, tecido de granulação, granulomas fúngicos (especialmente provocados por zigomicetos) e bacterianos (MILLER, 1983; SANTURIO et al., 2006a; DIAL, 2007; GAASTRA et al., 2010). Assim, métodos sorológicos e moleculares constituem poderosas ferramentas para diagnóstico precoce e preciso (GROOTERS et al., 2002a,b; SANTURIO et al., 2006a; DIAL, 2007; GAASTRA et al., 2010).

#### **2.2.10.1. Cultura**

O isolamento é considerado método padrão de diagnóstico (LACAZ et al., 2002; GROOTERS et al., 2002b; DIAL, 2007), porém sensibilidade do agente, associado a tempo de coleta frustram grande parte das tentativas. O agente é extremamente sensível a baixas temperaturas e amostras devem preferencialmente ser enviadas em temperatura ambiente. Requerem manuseio preciso e frequentemente existe contaminação bacteriana e fúngica secundária que limitam o crescimento do agente (DIAL, 2007).

Os zoósporos podem ser produzidos, a partir do cultivo de *P. insidiosum* em folhas de grama estéreis sobre ágar água a 2% e incubação a 37°C pelo período de 18 a 24 horas, que após incubação crescem a partir de hifas terminais (SANTURIO et al.,

2006a). A indução da zoosporogênese, além de ser método de diagnóstico, proporciona utilização em testes de susceptibilidade em modelos experimentais (PEREIRA et al., 2008).

### **2.2.10.2. Hematologia e bioquímica**

As alterações encontradas são inespecíficas. Evidência de inflamação crônica, como leucocitose e monocitose ou hipergamaglobulinemia com aumento de proteínas inflamatórias, com ou sem diminuição da albumina, pode apenas nortear a suspeita de doença fúngica, além de anemia e hipercalcemia, comuns em doenças granulomatosas (DIAL, 2007). As informações acerca dos constituintes sanguíneos dos animais infectados são de forma geral, genéricas e superficiais.

### **2.2.10.3. Citologia e Histopatologia**

Ambas as técnicas podem auxiliar, mas não permite diferenciação precisa entre pitiose e zigomicoses (GROOTERS, 2007). A citologia é largamente utilizada, porém os oomicetos, organismos fungo-símile, como *Pythium* e *Lagenidium* apresentam baixa afinidade por corantes usualmente utilizados (KAUFMAN, 1998; GROOTERS, 2003; DIAL, 2007).

A experiência do patologista é fundamental na análise de uma amostra em consonância com coleta apropriada do tecido lesado pelo clínico. Vale lembrar ainda, que devido a proliferação de tecido de granulação exuberante, áreas essenciais para o diagnóstico podem não ser contempladas em biópsias incisionais (REIS JR & NOGUEIRA, 2002). Basicamente três técnicas são utilizadas, uma em caráter complementar a outra, objetivando acurácia no diagnóstico: hematoxilina-eosina (HE), prata-metenamina (Grocott) e imuno-histoquímica.

Pela técnica de HE, identificam-se na pele, áreas irregulares e eosinofílicas de necrose, associadas ocasionalmente a imagens negativas tubuliformes de hifas fúngicas. Essas áreas normalmente correspondem aos *kunkers* a macroscopia. Ao

redor, pode-se observar infiltrado inflamatório constituído por numerosos eosinófilos e poucos macrófagos e neutrófilos, em permeio a marcada quantidade de tecido fibrovascular (MILLER & CAMPBELL, 1984; BROWN & ROBERTS, 1988; SALLIS et al., 2003; PEREIRA & MEIRELLES, 2007; GAASTRA et al., 2010). Podem ainda, serem encontradas células gigantes multinucleadas e reação de ‘Splendori-Hoepli’ (SANTURIO et al. 2006a; PEREIRA & MEIRELLES, 2007).

A forma rinofacial se expressa em ovinos tanto em pitiose, como em conidiobolomicose de modo muito similar macro e microscopicamente (RIET-CORREA et al., 2008; SANTURIO et al., 2008) demandando extrema cautela nas análises dos tecidos de ovinos, pois histologicamente, as diferenças são sutis e facilmente confundíveis. Em pitiose a reação de Splendori-Hoepli é mais discreta, as hifas têm paredes grossas e são alongadas, a despeito de hifas largas, com paredes finas em conidiobolomicose (RIET-CORREA et al., 2008). Além disso, zigomicetos podem provocar lesões na face, porém são considerados agentes oportunistas e normalmente não desencadeiam resposta eosinófila em hospedeiros infectados (WILLIAMS, 1969; SYMMERS, 1972 apud RIET-CORREA et al. 2008). Então, para uma maior acurácia, é prudente se utilizar de métodos de diagnóstico auxiliares.

Em cortes histológicos, pode-se valer de técnica há muito conhecida, porém de ampla aplicação em hifomicoses, através de coloração especial com sais de prata (Técnica de Grocott). Por meio dessa, é possível visibilizar hifas impregnadas de cor preta ou amarronzada, com paredes espessas, raramente septadas, com ramificações irregulares, encontradas na pele, nos *kunkers* ou intestino lesado, dentro de focos de mineralização; lembrando que *kunkers* facilmente encontrados em lesões cutâneas crônicas, não se formam em lesões gastroentéricas (MORTON et al. 1991; PROPHET et al., 1992; PURCELL et al., 1994).

A imuno-histoquímica tem sido amplamente utilizada a partir de análises de tecidos obtidos por biópsias ou necropsias, sendo altamente específica (DIAL, 2007). O princípio da técnica é similar ao ELISA indireto, com especificidade e sensibilidade largamente dependente do anticorpo primário (DIAL, 2007; GAASTRA et al., 2010). Permite diagnóstico etiológico preciso em tecidos recém coletados em que não há

material disponível para cultura, ou mesmo quando essas falham. Probabilidade de reações falso-positivos são pequenas, pois marcam epítomos específicos do reino Chromista, não sendo portanto encontrados nas hifas dos fungos zigomicetos (BROWN et al., 1988; MENDOZA et al., 1997; REIS & NOGUEIRA, 2002; PEDROSO et al., 2009).

#### **2.2.10.4. Técnicas sorológicas**

Diversos testes sorológicos estão disponíveis. A imunodifusão apresenta alta especificidade, porém com baixa sensibilidade, e testes de ELISA, aumentam o padrão de sensibilidade. Ambos requerem pessoas habilitadas para processamento. Pesquisadores afirmam que a metodologia do ELISA é bastante sensível e específica para detectar precocemente pitiose em hospedeiros infectados (MENDOZA & NEWTON, 2005). Além desses testes, outros com Western blot e dot-blot foram desenvolvidos. O último, para diagnóstico em humanos com pitiose cutânea ou vascular, pode ser utilizado em áreas rurais, pela praticidade e baixo custo (SANTURIO et al., 2006a,b; JINDAYOK et al., 2009).

A eficiência da imunodifusão para o soro-diagnóstico da pitiose e zigomicoses foi demonstrada, comprovando que este teste é eficiente para o diagnóstico diferencial dessas micoses em humanos e animais, com alta especificidade, porém com sensibilidade relativamente baixa (MENDOZA et al., 1986; SANTURIO et al., 2006b).

O ELISA foi desenvolvido para aumentar a sensibilidade e especificidade (GROOTERS 2002a, GAASTRA et al. 2010) e é utilizado em rotina de diagnóstico, devido a esses parâmetros aproximarem-se de 100% (SANTURIO et al., 2006b; DIAL, 2007). Esse teste pode ser utilizado tanto para diagnóstico precoce, como para evolução clínica, uma vez que títulos de anticorpos caem bruscamente, após cura da doença clínica (SANTURIO et al. 2006b; DIAL, 2007). Atualmente, segundo SANTURIO et al. (2006a,b) é considerada a mais eficiente técnica imunológica para se detectar casos precoces. Testes comparativos indicam que o teste de ELISA além de ser

eficiente para diagnóstico de pitiose, possui especificidade semelhante à imunodifusão, porém com maior sensibilidade (MENDOZA et al., 1997).

#### **2.2.10.5. Testes moleculares**

A principal vantagem do teste é a sensibilidade e a principal desvantagem é o controle de qualidade nos testes diagnósticos, devido à sensibilidade e contaminação de amostras com comunicação falso-positivo, além de alguns componentes dos meios ou acondicionamento em formol por longos períodos, que podem gerar resultados falso-negativo. Porém, com processamento adequado, permite identificação precisa de agentes, mesmo quando presentes em pequeno número na amostra (DIAL, 2007). Segundo GROOTERS & GEE (2002) a utilização de Nested PCR diminui a probabilidade de amplificação de regiões inespecíficas e assim incrementa a sensibilidade e especificidade desse tipo de teste. Sequenciamento gênico com amplificação do RNA ribossomal, região ITS1, através do PCR, é uma poderosa ferramenta para detecção e identificação de *P. insidiosum* (SANTURIO et al., 2006a). Entender a patogênese do oomiceto a níveis moleculares, de acordo com KRAJAEJUM et al. (2011), pode contribuir significativamente para novas perspectivas de tratamento.

#### **2.2.11. Terapias utilizadas em pitiose**

A pitiose destaca-se pela dificuldade no tratamento, apresentando pobre resposta a terapia (VICARIVENTO et al., 2008; GAASTRA et al., 2010). São utilizados diversos protocolos clínicos, abordagens cirúrgicas ou associação de ambos. Drogas antifúngicas de modo geral apresentam baixa eficácia, tornando a imunoterapia associada ou não a cirurgia como uma das principais opções terapêuticas (FOIL, 1996; MENDOZA & NEWTON, 2005; SANTURIO & FERREIRO, 2008).

Em protocolos clínicos, combinação de diversos tipos de terapêutica tem sido estimulada. *Pythium insidiosum* difere dos fungos verdadeiros na produção de zoóporos móveis biflagelados e na composição de sua parede celular, sendo que no primeiro a

parede contém celulose e beta-glucanas, e no segundo quitina. A membrana plasmática de *P. insidiosum*, agente fungo-símile, não contém esteróides (ergosterol), que é o componente alvo da maioria das drogas anti-fúngicas, provável causa do insucesso terapêutico com esses compostos (FOIL, 1996; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010).

Agentes que interferem com biosíntese de ergosterol como itraconazole, terbinafina e anfotericina B, além de iodeto de potássio e sódio apresentam efeitos variáveis, com controvérsias, considerando relatos de sucesso com uso dessas drogas em equinos por alguns autores (HUBERT & GROOTERS, 2002; GAASTRA et al, 2010). Dependendo do hospedeiro envolvido a resposta pode ser satisfatória, como no caso de ovinos acometidos por pitiose nasal (PEREIRA & MEIRELLES, 2007; RIET-CORREA et al., 2008). Recentemente, pela inibição da síntese de Beta-glucanas, principal componente da parede celular do oomiceto, a caspofungina tem sido testada (ARGENTA et al., 2010). Terapias sistêmicas associando itraconazol e terbinafina em cães e humanos têm se apresentado como efetivos, porém com custos elevados (HUBERT & GROOTERS, 2002).

Cirurgia radical, promovendo excisão total do granuloma com ampla margem de segurança é utilizada em equinos e humanos, nesses últimos, por vezes determinando amputação de membros. Ainda assim, podem existir altas taxas de recorrência (KRAJAEJUM et al, 2006; GAASTRA et al., 2010). Resultados satisfatórios podem ser obtidos, envolvendo excisão de lesões pequenas, recentes e superficiais (SANTURIO et al., 2006a). Dependendo da localização e evolução, a excisão com ampla margem e segurança torna-se difícil, pelo envolvimento de estruturas anatômicas profundas e importantes para o paciente (HUBERT & GROOTERS, 2002). Na área do pantanal, tratamentos empíricos a base de exérese e cauterização com ferro candente são amplamente preconizados (LEAL et al., 2001).

A imunoterapia, baseada no tratamento de cavalos infectados com antígenos extraídos de *P. insidiosum*, inicialmente preconizada por MILLER (1981), tem sido aperfeiçoada e utilizada nos últimos anos para tratamento da pitiose equina e humana (HUBERT & GROOTERS, 2002). Através dessa técnica não invasiva, se obteve índices

de cura em humanos ao redor de 55% e em equinos variando de 70 a 83% conforme relatos de diversos autores (MENDOZA & NEWTON, 2005; SANTURIO et al., 2006a). Os imunoterápicos são investigados sob diferentes técnicas de processamento, onde se procura preservar e pesquisar antígenos solúveis, que possam estimular a diferenciação da resposta imune, de modo a incrementar respostas terapêuticas, aplicáveis a usos curativos.

O mecanismo proposto para cura baseia-se principalmente na resposta celular, ainda que a humoral possa auxiliar na recuperação (MENDOZA & NEWTON, 2005; SANTURIO et al., 2006a). Em síntese, na pitiose natural, a resposta imune se relaciona a inflamação eosinofílica, com estimulação de linfócitos Th2 e liberação de interleucina quatro e cinco. Quando imunógenos são injetados, os antígenos presentes em seu APC são distintos da infecção natural e liberam interferon-gama que ativam linfócitos Th1. O Th1 ativado produz mais interferon-gama e interleucina 2, que ativam células mononucleares, como linfócitos Th1 e macrófagos, que por sua vez, danificam e destroem as hifas, promovendo a cura do hospedeiro (MENDOZA et al., 2003; MENDOZA & NEWTON, 2005; SANTURIO et al., 2006a).

## **CAPÍTULO 2 – PITIOSE CUTÂNEA EM EQUINOS: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

### **RESUMO**

Em função da semelhança morfológica de lesões decorrentes de pitiose, com outras doenças granulomatosas cutâneas em equinos, além da descaracterização inicial pelo uso de tratamentos inespecíficos, há necessidade de criteriosa investigação epidemiológica, clínica e laboratorial para se estabelecer o diagnóstico diferencial. Sendo assim, no presente trabalho estudaram-se os aspectos clínicos e morfológicos de casos de granulomas cutâneos em 13 equinos, provenientes das regiões de pantanal e cerrado do estado do Mato Grosso, Brasil. Dermatopatias devido pitiose (7/13) e sarcoide (4/13) foram as mais frequentes, correspondendo a 84,6% das afecções. Os restantes (15,4%) dos casos estudados envolveram tecidos de granulação inespecíficos, carcinoma epidermóide e melanoma, este último de ocorrência simultânea com pitiose.

**Palavras-chave:** pitiose, sarcoide, tecido de granulação, equinos, diagnóstico.

### **INTRODUÇÃO**

Frequentemente as dermatopatias são um aspecto frustrante da clínica de grandes animais, porque problemas cutâneos resultantes de diferentes causas podem apresentar-se com aspectos clínicos confundíveis (EVANS, 1993), especialmente entre os diferentes tipos de granulomas cutâneos em equinos, considerando semelhança entre pitiose, outras hifomicoses, habronemose ou sarcoide (ANTONIASSI et al., 2010; BELO REIS et al., 2011). Por isso é fundamental estabelecer diagnóstico diferencial (MEIRELES et al., 1993; YAGER & SCOTT, 1993; BIAVA et al., 2007; RAMOS et al., 2008). O êxito da terapia aplicada aos problemas de pele depende de uma abordagem sistemática por parte do clínico e as diferentes técnicas de diagnóstico devem ser utilizadas sempre que necessário (EVANS, 1993).

Biópsia de lesões granulomatosas e ulcerativas na pele de equinos são recomendáveis na fase inicial, como forma de direcionar os procedimentos terapêuticos, pois a maior parte dos tecidos analisados com suspeitas clínicas iniciais de sarcoide ou habronemose apresentou diagnóstico de pitiose com base no seu perfil histológico (SALLIS et al., 2003).

O objetivo deste trabalho é descrever e discutir os aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos da pitiose cutânea em equinos e outras dermatopatias passíveis de confundimento, comumente abordadas na rotina ambulatorial, com a finalidade de propor ferramentas de apoio para o diagnóstico diferencial dessas enfermidades.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram avaliados 13 casos clínicos de equinos que apresentaram dermatopatias persistentes, de evolução subaguda ou crônica, com lesões granulomatosas semelhantes entre esses indivíduos. Os animais foram examinados e acompanhados em datas distintas, em procedimentos realizados por veterinários de campo, com propósitos diagnósticos e terapêuticos. Os equinos incluídos neste estudo eram oriundos da região Norte de Mato Grosso, envolvendo áreas de pantanal e cerrado. O diagnóstico presuntivo baseou-se nos aspectos epidemiológicos, apresentação clínica e distribuição das lesões. Como auxílio diagnóstico para finalização dos casos e aplicação da terapêutica adequada, procedeu-se o exame histológico de fragmentos tecidos lesionados, colhidos através de biópsias incisionais, conservados em formalina a 10%, processados por técnica de rotina, corados pela hematoxilina-eosina (LUNA, 1968). Amostras de soro de 11 animais foram submetidas ao teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Pythium* (SANTURIO et al., 2006b).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A existência de dermatopatias envolvendo diferentes etiologias, tais como pitiose, sarcoide e tecidos de granulação inespecíficos, são bastante comuns na região

estudada e aponta para necessidade de exames complementares com a finalidade de confirmar o diagnóstico, tendo em vista a semelhança das lesões, por vezes descaracterizadas pelo uso de terapêutica empírica ou inadequada (Tabela 1).

Tabela 1. Demonstrativo de dermatopatias envolvendo pitiose e outras passíveis de confundimento ou associadas, em equinos oriundos dos biomas pantanal e cerrado do estado de Mato Grosso.

Caso	Diagnóstico histológico <sup>1</sup>	Diagnóstico sorológico <sup>2</sup>	Localização anatômica	Apresentação	Resolução/ evolução	Origem
1	Sarcóide	Negativo	Sulco escápula	Múltipla	Terapêutica cirúrgica	Pantanal
2	Sarcóide	Negativo	Lateral escápula	Única	Espontânea	Pantanal
3	Sarcóide	Negativo	Pinas, face e abdômen	Múltipla	Terapêutica cirúrgica	Cerrado
4	Sarcóide	Negativo	Peitoral e abdômen	Múltipla	Terapêutica cirúrgica	Cerrado
5	Tecido de granulação	Negativo	Membro pélvico esquerdo	Única	Espontânea	Pantanal
6	Pitiose	Positivo	Membro pélvico esquerdo (Calcâneo)	Única	Terapêutica clínica	Pantanal
7	Pitiose	Positivo	Porção média e distal dos membros	Múltipla	Terapêutica clínica e cirúrgica	Pantanal
8	Pitiose	Positivo	Membro pélvico esquerdo (canela)	Única	Terapêutica clínica	Pantanal
9	Tecido granulação / Pitiose	Positivo	Membro pélvico direito (canela)	Única	Terapêutica clínica e cirúrgica	Pantanal
10	Pitiose	Positivo	Membro pélvico esquerdo (canela)	Única	Terapêutica clínica e cirúrgica	Cerrado
11	Carcinoma epidermóide	NR	Olho esquerdo	Único	Terapêutica cirúrgica	Cerrado
12	Pitiose	Positivo	Períneo	Único	NR / Óbito	Pantanal
13	Melanoma Pitiose	NR	Face / cauda Membro torácico esquerdo	Múltiplos Única	NR / Óbito	Cerrado

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso / Laboratório de Patologia Veterinária

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria / Laboratório de Pesquisas Micológicas/ Teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico de pitiose.

NR Não realizado

Nos casos envolvendo pitiose, foram acometidos animais com idades variadas e não menos que 18 meses. Todos os casos segundo informações iniciaram no período das chuvas. A temporalidade de evolução das lesões em sua maioria variou de duas a oito semanas, notando-se rápida perda de peso, comparando-se a animais saudáveis do mesmo lote. As lesões iniciais ou subagudas (até 30 dias) eram circunscritas, apresentando-se côncavas ao centro e com bordas elevadas (Figura 1).



Figura 1. Pitiose cutânea, três semanas de evolução, em membro pélvico de equino.

Tendiam a formato elipsóide na condição mais crônica (acima de 60 dias), elevando-se na superfície ao centro e tornando as bordas rasadas (Figura 2).



Figura 2. Pitiose cutânea, oito semanas de evolução, em membro pélvico de equino.

Os diâmetros variaram de três a 35 cm, normalmente ulceradas, úmidas, brilhantes, por vezes com tecidos necróticos invadindo galerias cutâneas profundas e presença de massas branco-amareladas semelhantes a corais (*kunkers*) no seu interior. Essas massas, facilmente destacáveis, que podem ser eventualmente expelidas do sítio lesional, são forte indício de relação causal da lesão com *Pythium insidiosum*. Isto é relatado em diversos artigos (MENDOZA et al., 1996; LEAL et al., 2001; FREY JR et al., 2007; MACIEL et al., 2008), porém ocorre somente nos equinos, não sendo observado nas demais espécies quando infectadas (SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). Ilustrado na Figura 3.

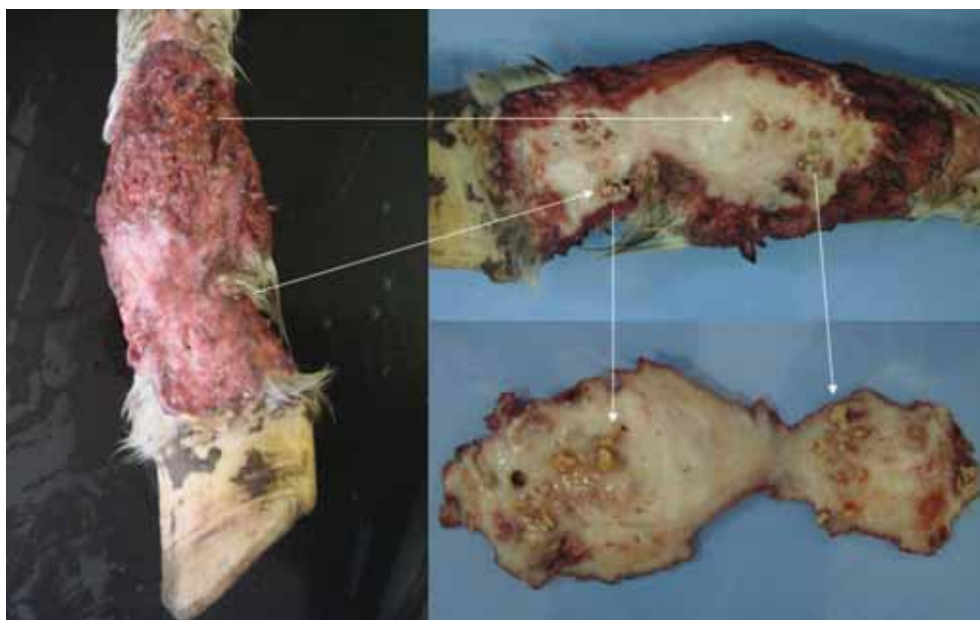


Figura 3. Detalhe de membro torácico de equino acometido por pitiose cutânea. Em permeio ao tecido de granulação observam-se diversos *kunkers* (grumos brancos amarelados indicados por setas), que aparecem em maior quantidade no tecido subcutâneo.

A distribuição das lesões ocorreu mais frequentemente nas porções médias ou distais dos membros, predominando apresentação única (85,71%) com relação a múltiplas (14,29%). O prurido nas áreas dos granulomas era evidente, e os animais se automutilavam com mordidas vigorosas e frequentes, sendo a superfície normalmente hemorrágica.

Nos casos diagnosticados como sarcoides (neoplasmas benignos, normalmente não metastáticos), as lesões eram circunscritas ou elípticas, com diâmetros variáveis, ora erodidas, ora ulceradas. Na superfície central, predominava a forma convexa com as bordas rasadas em continuidade limítrofe a tecido saudável e intimamente ligada a área circunjacente (Figura 4).



Figura 4. Equinos acometido por sarcoides nas regiões peitoral (A e B) e escapular (C e D), alguns já recorrentes (B) após exérese e cauterização com ferro candente.

A superfície normalmente apresentava-se brilhante, algumas úmidas e ressequidas, recobertas com crostas furfuráceas, por vezes acantóticas e esfoliantes. Aspectos variavam entre fibroblásticos e verrucosos.

A evolução desses casos foi lenta, geralmente sem prurido, por vezes permanecendo estacionada sem comprometer o escore corporal do animal. Não houve sazonalidade e em três casos houve recidivas após tratamento cirúrgico e um apresentou remissão espontânea. Na secção de tecidos após remoção, não se

observava *sinus*, tão pouco *kunkers*, apenas tecido de cor brancacenta, firme, medianamente ou muito vascularizado. Houve um caso de remissão espontânea. Esta dinâmica está de acordo com autores que afirmam que os sarcoides não fazem metástases, exibem manifestações clínicas variáveis, desde o crescimento invasivo agressivo até a regressão espontânea (NASIR & REID, 1999).

Os sarcoides distribuíram-se na face (próximo aos olhos e pinas), costados e região peitoral, próximo ao sulco da escápula e normalmente a apresentação era múltipla (75% dos casos).

O tecido de granulação inespecífico apresentou superfície brilhante, úmida, convexa e pruriginosa (Figura 5). Além disso, ao corte, possuía coloração brancacenta, consistência moderadamente firme ou friável dependendo do ponto, e com hemorragia em lençol. A evolução da lesão apresentou uma fase inicial rápida, manteve-se estacionada e regrediu após período de 60 dias com curativos locais. Não houve perda de escore corporal. A velocidade do processo de cicatrização nesses casos, sofre influência de diversos fatores, podendo ser afetada adversamente com aumento do tempo e custo de tratamentos (FERREIRA et al., 2010).

Um tecido de granulação exuberante se desenvolveu secundariamente a um carcinoma espinocelular no olho esquerdo de uma fêmea equina, da raça Árabe, com dez anos de idade e pelagem tordilha (Figura 6).

Esta neoplasia ocorre comumente em cavalos com pálpebras não pigmentadas, como também em genitália de equinos (MOORE, 1993). A despigmentação é um importante detalhe na abordagem diagnóstica, em conformidade com esse caso, o qual se caracterizava por extenso tecido de granulação, único, de formato circular, muito vascularizado, envolvendo a órbita ocular esquerda, de evolução crônica (acima de seis meses).



Figura 5. Tecido de granulação inespecífico decorrente de trauma em membro pélvico de equino com aproximadamente 45 dias de evolução



Figura 6. Equino acometido por carcinoma espinocelular recoberto por extenso tecido de granulação com seis meses de evolução.

Outro paciente apresentou melanoma associado com pitiose. Tratava-se de um equino, macho, adulto com 16 anos de idade. As lesões relativas ao melanoma distribuíram-se de modo aleatório, normalmente nodular, pigmentado, mais abundante na área facial e porção ventral da cauda (Figura 7B, 7C). No mesmo animal havia no membro torácico esquerdo tecido fibroso estendendo-se da canela ao boleto, entremeado por galerias preenchidas por *kunkers* (7A), com pitiose recorrente. É comum a incidência de melanoma em animais com idade avançada e plena e saudável atividade (EVANS, 1993; SOARES et al. 2009). Em contrapartida, casos de pitiose cursam com agravos e evolução que por vezes culminam em óbito natural, como nesse caso (LEAL et al., 2001; MACIEL et al. 2008).

A ocorrência de pitiose apresenta sazonalidade geralmente associada ao período chuvoso, além de apresentar como fator de risco a existência de ambiente onde há água estagnada (MILLER & CAMPBELL, 1982; LEAL et al., 2001), enquanto os sarcoides distribuem-se durante todo o ano. Na maioria dos casos de pitiose as lesões são únicas (SANTURIO et al., 2004), lesões multifocais são pouco

frequentes (CHAFFIN et al., 1992), com superfícies úmidas e evolução rápida e progressiva.



Figura 7. Membro torácico de equino acometido por pitiose (A). Notar numerosos *kunkers* no subcutâneo em permeio ao tecido de granulação (setas). Em B e C, numerosos nódulos pigmentados no mesmo animal, na região facial e porção ventral da cauda.

Os sarcoides apresentam-se geralmente de forma multifocal com alta propensão à recorrência geralmente com superfície discretamente úmida ou ressecada e de evolução normalmente lenta, por vezes estacionária (SCOTT & MILLER, 2003).

A influência da causa e o tempo de evolução do granuloma sobre o escore corporal é evidente. Em casos envolvendo sarcoides ou granulomas inespecíficos,

independente do tempo de evolução da lesão, o escore corporal dos animais permaneceu bom, enquanto nos de pitiose, após duas a três semanas de evolução a perda de peso foi notável. Isto pode ser explicado pela liberação de fatores de necrose tumoral que promovem fenômenos de caquexia (SANTURIO et al. 2004). A hemorragia crônica decorrente da automutilação em consequência do prurido também pode contribuir com a perda de peso.

A partir da segunda e terceira semana, já é possível observar perda de peso nos animais acometidos, com pacientes desenvolvendo enfermidade consuntiva crônica, que em fases terminais exibem caquexia extrema (Figura 8A-8D), em concordância com HEADLEY & ARRUDA JÚNIOR (2004), MACIEL et al. (2008), LÖFF et al. (2010). Animais que desenvolvem essa síndrome, por vezes ficam a maioria do tempo em decúbito (Figura 8A), apresentam anemia crônica, perda de íons constante e hipoproteïnemia, além de fraqueza geral, em três a sete meses de curso clínico.



Figura 8. Animais acometidos por pitiose cutânea avançada. Observar acentuada caquexia, em animais tratados (A e B) e não tratados (C e D).

Ressalta-se que na região do pantanal foram verificados casos atípicos de pitiose crônica envolvendo apresentação subcutânea sem influência sobre o escore corporal (LEAL et al., 2001), confundíveis com sarcoides ou mesmo apresentarem-se associados, pois os sarcoides ulcerados podem predispor a penetração de *P. insidiosum*. Nesses casos, a presença dos *kunkers* seria fundamental para o diagnóstico.

Muares são igualmente afetados, seguindo os mesmos padrões de sinais progressivos e crônicos, porém os sítios lesionados se expressaram inicialmente sob a forma nodular com fístulas (9AB), ulcerando a medida que cronificavam (Figura 9A). Tal como ocorre na espécie equina, os muares também produzem *kunkers*. Assim, essa formação é característica de *Equidae*, ou seja, pode atingir equinos e muares, não sendo verificadas em outras espécies.



Figura 9. Muares acometidos por pitiose cutânea. Em A, lesão nodular inicial que se tornou ulcerada, na região peitoral, em um período de 90 dias. Em B, lesão nodular fistulada na região do abdômen ventral.

Dados epidemiológicos e clínicos das dermatopatias em equinos, envolvendo localização, evolução, aspectos e sazonalidade das lesões, frequência de recidivas e comprometimento de escore corporal são informações que permitem nortear suspeitas na primeira abordagem do diagnóstico diferencial. Estes diferenciais estão sintetizados na Tabela 2 e seguidos de breve discussão.

Tabela 2. Dados resumidos para auxílio na abordagem clínica para diagnóstico de dermatopatias em equinos.

<b>Etiologia da dermatopatia</b>	<b>Características epidemiológicas e clínicas mais comuns</b>	<b>Características morfológicas da(s) lesão(ões)</b>	<b>Detalhe importante</b>
Pitiose <sup>a b</sup>	Emagrecimento Normalmente pruriginosa Relação ambiente alagado Maior incidência período chuvoso Sem nenhum fator de predileção Lesões mediais ou distais	Normalmente única Muito Secretória Circunscritas Bordas elevadas no início Crescimento rápido	Presença de <i>kunkers</i> na macroscopia  Presença de hifas na histologia  Não responsivo a ivermectinas ou inibidores da colinesterase
Sarcoides <sup>a</sup>	Escore corporal normal Normalmente não pruriginosa Sem relação climática ou ambiental Animais mais jovens Lesões proximais (abdômen e face)	Normalmente múltipla Discretamente secretória ou ressequida Aspecto fibroblástico ou verrucoso Bordas rasadas	<i>Kunkers</i> ausentes
Tecido de granulação inespecífico <sup>a</sup>	Escore corporal normal Prurido variável Relação com trauma prévio Todas as idades Desenvolvimento mais comum em membros	Únicas Medianamente secretórias Formato irregular Crescimento rápido e estacionário Bordas rasadas	Muito hemorrágicas
Carcinoma epidermóide <sup>a</sup>	Escore corporal variável Prurido ausente Relação altas temperaturas e exposição solar Animais adultos Comum em olhos, órbita e genitais	Únicas ou múltiplas Secretórias Ulceradas Crescimento lento	Normalmente áreas despigmentadas ou de transição
Melanomas <sup>a</sup>	Escore corporal normal Prurido ausente Animais acima de 5 anos Pelagem tordilha Lesões base da cauda, face e genitais	Normalmente múltiplas Nodulares Pigmentadas Não ulceradas Crescimento lento	Animais senis com pelagem tordilha
Habronemose <sup>a</sup>	Escore corporal normal Prurido presente Todas as idades Comum áreas de transição mucocutâneas, face, 3ª pálpebra Mais comum no verão	Normalmente única Secretória Ulceradas Circunscritas Crescimento rápido	<i>Kunkers</i> ausentes  Presença de larvas na histopatologia  Responsivo a ivermectinas ou inibidores de colinesterase

<sup>a</sup> Diagnóstico histopatológico

<sup>b</sup> Diagnóstico sorológico (Teste de ELISA indireto para diagnóstico de pitios)

As diferenças na distribuição das lesões pelo corpo dos animais podem ser explicadas pelo fato de que a forma infectante do *Pythium insidiosum* está presente na vegetação aquática e os equinos que pastejam em áreas alagadas permanecem com os membros parcialmente submersos (CHAFFIN et al., 1995; FOIL, 1996), sendo um importante fator predisponente para desenvolvimento da pitiose.

Apesar da realização da biópsia e exame histológico, alguns diagnósticos não raramente permanecem inconclusivos ou falsamente negativos, pois os tecidos analisados podem contemplar apenas tecido de granulação, e a área infectada pelo *Pythium* pode não ser amostrada. Diversos autores (REIS JR & NOGUEIRA, 2002; SANTURIO et al. 2006a) relataram essa possibilidade, pois em formações exuberantes de tecido de granulação, as áreas focais de necrose podem ficar distantes uma das outras e frequentemente não são acessadas em biópsias incisionais. Por isso sugere-se coleta abrangente, incluindo a área de transição com tecido normal.

Uma suspeita comumente presente é a habronemose cutânea, sendo o diagnóstico baseado no encontro de larvas de helmintos no tecido analisado (PRESTES & MOYA, 2008). O diagnóstico presuntivo baseado nos aspectos macroscópicos das lesões desta enfermidade é muito frequente entre técnicos, porém em diversos trabalhos os exames histológicos indicaram outra etiologia na maioria dos casos (SALLIS et al., 2003; MACIEL et al., 2008) sendo a pitiose a causa mais diagnosticada (REIS JR & NOGUEIRA, 2002; SALLIS et al. 2003). Deve ser considerada no diagnóstico diferencial de todas as lesões ulcerativas não-cicatrizantes, dada a aparência macroscópica, particularmente nas lesões que envolvem junções mucocutâneas. Qualquer lesão ulcerativa pode ser infectada pelo *Habronema* sp secundária e causa primária passará despercebida, se as biópsias para histopatologia da mesma forma não forem realizadas adequadamente (EVANS, 1993). Ressalte-se que neste estudo, no sítio lesional de infecções por *P. insidiosum*, apesar da ulceração, mííases foram incomuns. Provavelmente o microambiente com predomínio de eosinófilos seja desfavorável ao desenvolvimento de larvas.

O teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico de pitiose foi efetuado em 11 animais do estudo e os resultados apresentaram total concordância com os

diagnósticos histológicos, demonstrando ser um teste de grande auxílio para a investigação causal da lesão. Mesmo sendo pouco utilizada, é uma importante ferramenta para o diagnóstico precoce, além de apresentar características de rapidez e praticidade, apresentam sensibilidade e especificidade de 91,66% e 95,83%, respectivamente (SANTURIO et al., 2006b).

## CONCLUSÃO

As abordagens epidemiológicas e clínicas, seguidas de colheitas de amostras biológicas visando exames complementares e análise criteriosa do conjunto das informações amplia a possibilidade de êxito no diagnóstico correto, prognóstico e terapêutica adequada das dermatopatias em equinos.

---

Trabalho posteriormente adaptado as normas do periódico Revista Brasileira de Medicina Equina, que após submissão foi aceito e publicado conforme referência abaixo:

SANTOS, C. E. P.; MARQUES, L. C.; SANTURIO, J. M.; JULIANO, R. S.; SILVA, J. A. Pitiose cutânea em equinos: diagnóstico diferencial. **Revista Brasileira de Medicina Equina**, São Paulo, v. 32, p. 24-27, 2010.\*

\*De acordo com ABNT 6023

## CAPÍTULO 3 – PITIOSE EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO NO PANTANAL MATOGROSSENSE

### RESUMO

Realizou-se, em quatro propriedades rurais no Pantanal Matogrossense, em 2009 e 2010, um estudo clínico e epidemiológico da pitiose em bovinos e equinos. A enfermidade ocorreu predominantemente entre os meses de novembro e março, correspondendo ao período chuvoso na região. A incidência média anual foi de 0,22% e 12,5% em bovinos e equinos, respectivamente. Nos bovinos, a distribuição dos casos ocorreu no ápice das cheias e restringiu-se a novilhas de 6 a 18 meses de idade, nas quais as lesões cutâneas estiveram associadas com edemas perilesionais discretos e claudicações, mas curaram espontaneamente, em um período máximo de 90 dias. Nos equinos, a pitiose acometeu animais de ambos os sexos, de três a oito anos de idade e registrou-se um caso de reinfecção. A doença evoluiu com agravos no sítio lesional, com desenvolvimento de extenso tecido de granulação, *kunkers* em perimeio à lesão, acentuada caquexia e mortes, as quais ocorreram entre três e sete meses após o início dos sinais. A mortalidade média foi 5,88% e a letalidade, 45,45%. A confirmação do diagnóstico incluiu ELISA-teste, PCR, histopatologia (HE e Grocott) e isolamento de *P. insidiosum*. Na área endêmica estudada, a enfermidade não causou impacto econômico em bovinos, a despeito da evolução insatisfatória registrada na maioria dos equinos. Nesse estudo, a incidência de pitiose em equinos foi 57,23 vezes a observada em bovinos, com significância estatística. Apesar das mesmas condições ambientais, tal diferença foi provavelmente associada com susceptibilidade, comportamento e manejo das espécies nos campos alagados.

**Palavras-chave:** Oomicetos, *Pythium insidiosum*, pitiose, equinos, bovinos, epidemiologia.

## INTRODUÇÃO

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa do tecido subcutâneo causada por *Pythium insidiosum*, micro-organismo classificado no Reino Straminipila, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales e Família Pythiaceae (SANTURIO et al., 2006a). A pitiose tem sido descrita em equinos, bovinos, caprinos, ovinos, caninos, felinos, humanos (ALEXOPOULOS et al., 1996), mamíferos selvagens (CAMUS et al., 2004) e aves (PESAVENTO et al., 2008). A doença é intimamente associada com o contato de animais e humanos com águas contaminadas com zoósporos móveis, forma infectante de *P. insidiosum*. Não há predisposição por sexo, idade, ou raça, nem há relato de transmissão direta entre animais, ou entre animais e humanos (MENDOZA et al., 1996; GAASTRA et al., 2010).

O prejuízo provocado pela pitiose em equinos, espécie mais atingida, é bem documentado e inclui disfunção, custos de tratamento e mortes esporádicas (MENDOZA & ALFARO, 1986; LEAL et al., 2001; FREY Jr et al., 2007). Em ovinos, embora pouco relatada, o curso clínico é grave e com desfecho fatal (TABOSA et al., 2004; SANTURIO et al., 2008). Em contrapartida, nos casos em bovinos, predomina cura espontânea (SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009).

Devido à dificuldade de diferenciar pitiose de outras infecções fúngicas, o diagnóstico deve incluir, além da histopatologia, outros métodos. Isolamento e identificação do micro-organismo (LACAZ et al., 2002) nem sempre apresenta êxito. A identificação precoce da doença, no entanto, é difícil através desses métodos, mas a sorologia por ELISA apresenta boas sensibilidade e especificidade (LACAZ et al., 2002; SANTURIO et al., 2006b; DIAL, 2007). Imuno-histoquímica e reação em cadeia de polimerase podem ser utilizadas em tecidos apropriadamente preservados (RODRIGUES et al., 2006; DIAL, 2007; GABRIEL et al., 2008). Esse trabalho relata, comparativamente, a dinâmica e o perfil da pitiose em hospedeiros bovinos e equinos, além de enfatizar os aspectos epidemiológicos da doença no Pantanal Matogrossense, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos em quatro propriedades, onde foram relatados casos suspeitos da enfermidade em 11 equinos e sete bovinos, nas áreas rurais distribuídas ao longo da rodovia Transpantaneira, município de Poconé, MT. Foram incluídos no estudo animais que desenvolveram lesões cutâneas com formação de tecido de granulação no período 2009-2010. Esse estudo associou método descritivo observacional com analítico comparativo, entre espécies estudadas.

Fragmentos de tecidos mantidos em temperatura ambiente e também refrigerados, obtidos por biópsias incisionais de sete bovinos e onze equinos foram coletados e encaminhados aos Laboratórios de Microbiologia Veterinária e Patologia Veterinária (LMV e LPV) e Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), bem como ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), neste para isolamento e cultivo do agente causal. Para o isolamento, fragmentos de tecidos afetados, obtidos por biópsia foram lavados em água estéril e em seguida semeados em tubos com tampa de rosca contendo Meio Mínimo, Agar Saboraud Dextrose (ASD) ou Micosel e após foram incubados a 37°C, por 48 horas. A identificação considerou características macroscópicas e microscópicas de *P. insidiosum*, além da indução da zoosporogênese (PEREIRA et al., 2007). Adicionalmente, realizou-se caracterização molecular (PCR) nos tecidos, segundo BOTTON et al. (2011), com *primers* específicos para *P. insidiosum*.

Para a histopatologia, fragmentos de tecidos foram fixados em formalina 10%, processados por técnicas de rotina, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e prata-metenamina de Grocott (GMS) (PROPHET et al., 1992). Amostras sorológicas dos animais acometidos foram testadas para anticorpos específicos anti-*Pythium* pelo ensaio imunoenzimático indireto em fase sólida, no LAPEMI (SANTURIO et al., 2006b).

Para o estudo de novos casos em uma população de indivíduos sob risco, durante intervalo de tempo específico (estudo prospectivo), adotou-se incidência como medida de frequência (HENNEKENS & BURING, 1987). Face à frequência esperada

em qualquer uma das quatro células ser inferior a cinco, utilizou-se o teste exato de Fischer, através do Programa Epi Info, versão 6.0 (DEAN et al., 2001) e verificou-se o risco relativo de bovinos e equinos desenvolverem a doença (PETRIE & WATSON, 2009).

## RESULTADOS

Os casos distribuíram-se nos meses de dezembro a abril de 2009 e 2010, com maior concentração em dezembro e janeiro que corresponde ao ápice do período chuvoso na região. O perfil epidemiológico sumarizado das ocorrências está apresentado na Tabela 3. Em bovinos, a ocorrência variou de 0,15 a 3,64% e não houve nenhuma morte. Em equinos, registrou-se 5,88 a 28,57% de incidência, com índices de mortalidade e letalidade similares, variando de 40-100%.

Tabela 3. Perfil epidemiológico de pitiose cutânea em animais de produção (2009-2010), em quatro propriedades rurais no município de Poconé, Pantanal Matogrossense.

PR <sup>a</sup>	Ano	Bovinos				Equinos				
		Nº de expostos	Nº de casos	Incidência (%)	Mortalidade (%)	Nº de expostos	Nº de casos	Incidência (%)	Mortalidade (%)	Letalidade (%)
1	2009	550	01	0,18	0	17	01	5,88 <sup>b</sup>	5,88	100
2	2009	600	01	0,17	0	32	03	9,38 <sup>c</sup>	00	00
3	2010	55	02	3,64	0	07	02	28,57 <sup>b</sup>	28,57	100
4	2010	2000	03	0,15	0	32	05	15,63 <sup>c</sup>	6,25	40
Total		3205	07	0,22	0	88	11	12,5	5,68	45,45

<sup>a</sup> Propriedade rural, <sup>b</sup> não tratados, <sup>c</sup> tratados.

A preferência dos bovinos por áreas mais secas (coxilhas=cordilheiras) para pastejo e permanência contrastou com o comportamento registrado em equinos que se mantinham em locais com acúmulos de água (baías ou lagoas), campos inundadas com drenagem lenta e vegetação aquática abundante (Figura10 e Figura 11).



Figura 10. **(A)** Equinos distribuídos nos campos do Pantanal Matogrossense durante o período de cheia (fevereiro de 2010) com abundante vegetação aquática. **(B)** Equino no período de estiagem (setembro de 2009) em estação em lagoa eutrofizada.



Figura 11. Equinos e bovinos distribuídos em dois campos parcialmente alagados no final do período chuvoso (março/2009) na região de Poconé-MT. Observar aspectos comportamentais diferenciados das duas espécies, segregados, com bovinos preferindo pastar e permanecer em locais mais altos e secos (cordilheiras), contrariamente ao equino, que prefere permanecer e pastar em locais de drenagem lenta como pequenas baías ou lagoas, com membros parcialmente submersos.

Além disso, a condução dos bovinos às áreas mais secas era prática de manejo usual, em situação de cheias. Houve associação entre a espécie e a incidência da doença. O risco para equinos foi 12,5% e, para bovinos, 0,22%, conforme disposto na Tabela 4. A incidência de pitiose em equinos foi 57,23 (risco relativo) vezes a observada em bovinos (teste de exato de Fisher;  $P < 0,0001$  e Intervalo de Confiança a 95% variando de 22,72-144,14).

Tabela 4. Estudo de coorte sobre pitiose cutânea em animais de produção de quatro propriedades rurais do Pantanal Matogrossense (2009-2010).

Espécie	Pitiose cutânea		Total	Risco / Risco relativo
	Sim	Não		
Equinos	11	77	88	11/88 <sup>Re</sup>
Bovinos	07	3198	3205	7/3205 <sup>Rb</sup>
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>3275</b>	<b>3293</b>	<b>57,23<sup>RR</sup></b>

R<sub>e</sub> = Risco equino, R<sub>b</sub> = Risco bovino, RR = Razão de risco ou risco relativo

Teste exato de Fisher; Intervalo de Confiança a 95% (22,72-144,14).

Sete casos foram registrados em bovinos, todos em novilhas (seis a 18 meses), com graus variados de mestiçagem e bom escore corporal. As lesões cutâneas apresentavam-se usualmente apendiculares distais, únicas ou múltiplas e, inicialmente (até dez dias), circunscritas e com superfícies planas, hemorrágicas, úmidas e brilhantes (Figura 12).



Figura 12. (A) Novilha, cinco meses de idade, com lesão cutânea distal no membro pélvico, decorrente de pitiose. (B) Padrão circunscrito, superfície úmida, vermelha e brilhante em lesão recente, com menos de dez dias de evolução.

Nas fases mais tardias (20 a 40 dias), seguia-se a forma elíptica, às vezes disforme, com superfície ressequida e hiperêmica. Na fase de resolução, apresentavam bordas em linha escuras e angulares (Figura 13).



Figura 13. (A) Novilha, 12 meses de idade, com lesões distais nos membros pélvicos, decorrentes de pitiose. (B) Lesões cutâneas em diferentes graus de resolução, padrão disforme, com bordas angulares, coloração avermelhada, moderadamente ressequida, com discretos focos hemorrágicos, entre 20 e 40 dias de evolução.

Discreto edema adjacente foi identificado em seis novilhas e claudicação, em duas. O caso mais persistente (mais de 60 dias) foi associado com edema e ulceração profunda, além de claudicação. Nenhum caso bovino foi tratado e todos curaram espontaneamente, sem qualquer registro de perda de escore corporal. O tempo para remissão total das lesões foi de três semanas a três meses.

Os equinos sem raça definida (n=6), ou da raça pantaneira (n=5) apresentavam bom estado corporal inicial, porém, verificava-se rápida perda de peso a partir da segunda ou terceira semana de evolução da lesão cutânea. Os casos afetaram onze equinos adultos com 3 a 8 anos de idade. As lesões eram de localização axial ou apendicular (proximal ou distal), únicas ou múltiplas (Figura 14) e, inicialmente (até 20 dias de evolução), circunscritas, com superfície central côncava e bordas proeminentes, mas à medida que cronificavam, tornavam-se elípticas com superfície central projetada, friáveis e com secreções serosanguinolentas.



Figura 14. Equino, fêmea, quatro anos de idade, com lesões multifocais decorrentes de pitiose, na extremidade distal de membros torácicos. **(A)** Severa emaciação do animal afetado após três meses de evolução. **(B)** Detalhe das lesões, com superfície úmida, tecido de granulação, *kunkers* em permeio ao tecido distribuídos principalmente nas bordas. O quadro evoluiu para a morte, cerca de 30 dias mais tarde.

Às vezes, havia *sinus* e focos necróticos de onde era possível extrair *kunkers* (materiais brancos ou amarelados semelhantes a corais), com dois a 20 mm. Esses

*kunkers* aumentavam proporcionalmente à condição temporal da lesão. Um caso foi associado à trauma prévio (laceração com arame). Todas as lesões apresentaram caráter progressivo e susceptível a agravos. Três dos 11 equinos não foram submetidos a tratamento e evoluíram, em três a sete meses, a grave caquexia (Fig. 14A) que antecedeu as mortes. De oito equinos tratados com imunoterápicos (Pitium Vac®) associados, ou não a debridamento cirúrgico, observou-se remissão dos sinais clínicos em seis e refratariedade em dois que morreram, de forma semelhante ao ocorrido nos equinos não tratados. O equino que teve lesão abdominal havia desenvolvido pitiose em um membro pélvico, dois anos antes.

*P. insidiosum* foi isolado somente de amostras de equinos e cresceu em Meio Mínimo como hifas hialinas submersas, parcialmente septadas e com ramificações perpendiculares laterais, em ângulo reto. Nas amostras de bovinos, havia crescimento parcial, porém à repicagem, ocorria contaminação bacteriana secundária.

Nas amostras de bovinos, observou-se à microscopia, múltiplos focos de necrose com infiltrado granulomatoso composto por macrófagos, neutrófilos e, por vezes, células gigantes multinucleadas contendo estruturas tubuliformes semelhantes a hifas fúngicas. Havia intensa proliferação de tecido de granulação, acantose e hiperqueratose e, na derme, observou-se infiltrado granulomatoso perivascular moderado com presença de macrófagos e eosinófilos. Nas amostras de equinos, havia intensa proliferação de tecido de granulação com necrose multifocal contendo imagens negativas tubuliformes de hifas ramificadas e irregulares. Ao redor das áreas de necrose, os infiltrados eram predominantemente compostos por eosinófilos, macrófagos e raras células gigantes. Nas duas espécies houve impregnação das hifas pela coloração de prata. As biópsias e as amostras de soro dos animais em concordância com achados histológicos foram sororreagentes no teste de ELISA e, através da técnica de PCR, amplificaram um fragmento de aproximadamente 105pb que caracteriza *Pythium insidiosum*.

## DISCUSSÃO

O padrão de distribuição temporal dos casos de pitiose no Pantanal Matogrossense segue o mesmo perfil nos rebanhos estudados, em ambas as espécies estudadas, de forma similar aos registros da Austrália, onde os casos também se concentram em verões chuvosos (MILLER et al., 1985; LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a). A frequência de casos na espécie equina é maior que na espécie bovina. Considerando a proporção entre o número de animais expostos e os que desenvolveram a doença no período estudado, pode-se dizer que a incidência da pitiose em equinos foi 57,23 vezes a observada em bovinos. Embora expostos às mesmas condições ambientais, o padrão de comportamento das espécies possivelmente influenciou a ocorrência da doença, pois os equinos se mantiveram mais tempo nos locais alagadiços, em comparação com os bovinos, os quais preferiam, ou eram conduzidos às coxilhas nas situações de alagamentos. Assim, equinos têm maior risco de contato com as formas infectantes do agente. Entretanto, os bovinos apenas permaneciam em locais inundados espontaneamente, se não houvesse a alternativa de alimento e refúgio em áreas mais altas e secas. São reconhecidas essas influências ambientais e a presença de zoósporos infectantes em locais de vegetação aquática abundante e alta temperatura (MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). Essas particularidades podem estar associadas com a frequência em bovinos somente no pico da cheia e uma maior frequência por períodos mais extensos em equinos. Outros relatos associam áreas alagáveis com casos de pitiose, tanto em bovinos (GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009), quanto em equinos (LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a). Ressalta-se que vários aspectos podem mascarar quantitativamente as ocorrências nos bovinos, subestimando-as. Entre estes, incluem-se lesões apendiculares distais recobertas parcialmente por barro (difícil visibilização), curso clínico não tão prolongado (quanto em equinos), manejo em áreas extensas e de vegetação abundante, manejo pouco frequente associado com grande número de animais e ausência de comprometimento orgânico mais severo. Questionamentos semelhantes foram discutidos por GRECCO et al. (2009).

Na população estudada, a enfermidade acometeu bovinos jovens e equinos adultos. Os aspectos da apresentação clínica da pitiose em bovinos jovens (MILLER et al., 1985; SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008) ou equinos adultos (SANTOS et al., 1987; LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a; FREY JR et al., 2007) têm sido amplamente descritos. A regressão espontânea das lesões em bovinos contrastou drasticamente com a evolução desfavorável da doença em equinos, os quais inclusive, em períodos similares de tempo, apresentavam considerável perda de peso, além de mortes. Acredita-se que a participação de mediadores inflamatórios seja responsável pelo quadro de caquexia nos equinos (LEAL et al., 2001). Cursos clínicos de ampla cronicidade, com perda de peso em equinos submetidos ou não a tratamentos e seguidos por mortes foram frequentemente relatados (SANTOS et al., 1987; ALFARO & MENDOZA, 1990; LEAL et al., 2001; FREY Jr et al., 2007; MACIEL et al., 2008). Ressalta-se que todos equinos não tratados, além de dois (dos oito) tratados com imunoterapia, morreram. Por certo, mesmo com tratamentos diversificados, a maioria dos casos crônicos é fatal (MENDOZA & ALFARO, 1986; ALFARO & MENDOZA, 1990). A imunoterapia no grupo de animais tratados impossibilita quaisquer suposições associadas com o curso natural dos casos sem a intervenção.

Provavelmente, padrões diferenciados de resistência entre espécies susceptíveis relativos à imunidade inata e adquirida influenciam o perfil de apresentação clínica. Reforça tal hipótese o padrão histológico da lesão, também, diferenciado e homogêneo entre as espécies estudadas. No sítio lesional, os bovinos apresentaram populações celulares compostas por polimorfonucleares, predomínio de macrófagos e células gigantes. Relatos prévios concordam com esse aspecto (PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009). A imunidade inata, considerada mecanismo inespecífico da resposta imune, constitui a primeira linha de defesa contra infecções, sem necessidade de sensibilização prévia e é caracterizada por fagocitose e digestão de micro-organismos e substâncias estranhas por macrófagos e leucócitos (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; ADEREM & ULEVITCH, 2000). A célula gigante originada a partir de múltiplas divisões nucleares sem divisão do citoplasma tem maior

função secretora de enzimas, além de grande capacidade de fagocitose (TIZARD, 2002), provavelmente tendo importante papel na destruição de hifas. Isto sugere que, em bovinos, o reflexo da eficiente imunidade inata seria o rápido curso clínico em animais predominantemente jovens, imaturos imunologicamente. Por sua vez, a ativação da resposta imune inata, desencadeia uma rede de citocinas, pré-requisito da imunidade adquirida (AKIRA et al., 2001; KOKKINOPOULUS et al., 2005). Assim, a imunidade adquirida ativada preveniria o desenvolvimento da doença em bovinos adultos, conforme observado aqui e em outros estudos (SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009).

Nos equinos, o padrão histológico incluiu infiltrados predominantemente eosinofílico e raras células gigantes. Segundo MILLER & CAMPBELL (1984), os *kunkers* encontrados nessa espécie apresentam-se como coágulos eosinofílicos de tamanhos variados compostos de hifas, colágeno e células inflamatórias. De acordo com MILLER (1981), mesmo antigênicas, as hifas não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro devido à marcante ação inflamatória. Provavelmente, o mecanismo de evasão de *P. insidiosum* do sistema imune do hospedeiro equino seja mais eficiente e fragilize tanto a resposta inata o que pode estar associado com curso clínico crônico e morte precedida de caquexia progressiva (LEAL et al., 2001), quanto a adquirida, considerando a incidência em equinos adultos e, por vezes, recorrentes, quando de tratamentos diversificados, ou através de excisões cirúrgicas (LEAL et al., 2001; BIAVA et al., 2007). Reinfecções, conforme se verificou em um dos equinos (SANTOS et al., 2011), pode indicar frágil imunidade adquirida. SANTURIO et al. (2006a) descrevem que embora níveis aumentados de anticorpos possam auxiliar a recuperação de equinos que desenvolvam pitiose, os mecanismos envolvidos na cura baseiam-se principalmente na resposta celular, fato sustentado pela alteração tecidual após tratamento com imunoterapia, em que há mudança de inflamação eosinofílica inicial para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T ao final da resposta.

Considerando-se frequência, evolução e padrão histológico dos hospedeiros estudados, supõe-se que macrófagos e células gigantes, além de outras

particularidades relativas à imunidade inata e adquirida, têm papel essencial na patogênese da pitiose e que são necessários estudos adicionais sobre os mecanismos relacionados com a fagocitose desse oomiceto por essas células e suas funções.

Em conjunto, achados epidemiológicos, clínicos e histopatológicos foram consistentes para o diagnóstico de pitiose em todos os casos estudados e apresentaram total concordância com testes de ELISA, tanto para os equinos, quanto para os bovinos. Isolou-se o patógeno das amostras de equinos, porém dificuldades com relação ao isolamento das amostras provenientes de bovinos foram marcantes, como ocorrido previamente (PÉREZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009). O isolamento, além de requerer tempo, pode gerar resultado falso negativo. Assim, a reação em cadeia de polimerase foi fundamental para consolidar o diagnóstico nos tecidos dos bovinos analisados (DIAL, 2007; GAASTRA et al., 2010).

## CONCLUSÃO

As informações deste estudo descritivo, em caráter comparativo, auxiliam a compreensão dos mecanismos envolvidos na pitiose em ambas as espécies. Além disso, os aspectos epidemiológicos aqui descritos constituem registro importante da ocorrência da doença em animais de produção no Pantanal Matogrossense.

---

Trabalho posteriormente adaptado as normas do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira, que após submissão foi aceito e publicado conforme referência abaixo:

SANTOS, C. E. P. DOS; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Pitiose em animais de produção do pantanal matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 103-1089, 2011.

## CAPÍTULO 4 - EPIDEMIOLOGIA DA PITIOSE EM EQUIDEOS DE UMA SUB-REGIÃO DO PANTANAL MATOGROSSENSE E ÁREAS LÍMITROFES

### RESUMO

Realizou-se, em trinta e quatro propriedades rurais em sub-região do Pantanal Matogrossense e áreas limítrofes, no período de 2007 a 2010, um estudo clínico e epidemiológico em setenta e seis equideos acometidos de pitiose, com validação dos casos através de ELISA-teste, PCR, histopatologia (HE e Grocott) e isolamento de *Pyhium insidiosum*. Com relação à distribuição espacial, a maior amplitude de eventos (85,53%) ocorreu no bioma Pantanal. A enfermidade ocorreu predominantemente no período chuvoso, com os maiores picos nos meses de janeiro e março, declinando bruscamente no período de estiagem (abril a setembro). No pantanal a prevalência variou de 0,9-66,67% e no cerrado entre 2,17-33,33%. De um modo geral, considerando o número total de animais expostos, a prevalência nos dois biomas situa-se em torno de 5%, sem diferença estatística entre regiões. Índices de mortalidade e letalidade variaram de 1,25 a 23,08% (pantanal) e 2,31 a 45,45% (cerrado), ressaltando que esses índices tornaram-se subestimados, dada a utilização da imunoterapia em um grupo de animais, principalmente no pantanal. Embora a enfermidade possa afetar equinos em qualquer idade, houve associação entre essa variável e a prevalência da doença, que em animais acima de um ano foi 8,07 vezes a observada nos animais abaixo de um ano, nas mesmas condições de exposição, com significância estatística. Houve associação também quanto à frequência de distribuição das lesões, que foi maior em sítios pigmentados e consonantes com áreas corpóreas parasitadas por *Tabanidae*. Além disso, considerando a grande prevalência desses vetores, com picos populacionais no início do período chuvoso, na mesma distribuição espacial e temporal de pitiose, surge hipótese de provável participação desses dípteros na cadeia epidemiológica de *P. insidiosum*. Assim, futuros estudos devem ser conduzidos para melhor compreender a possível relação do vetor com oomiceto, na ocorrência de pitiose no hospedeiro equino.

**Palavras-chave:** oomiceto, epidemiologia, *Pythium insidiosum*, *Tabanidae*.

## INTRODUÇÃO

Pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa cutânea de aves e mamíferos, por vezes podendo atingir outros tecidos. É uma doença cosmopolita ocorrendo em áreas de clima tropical, subtropical e temperadas (MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010), no entanto, recentemente tem sido observada em outros locais onde o clima não se enquadra nestas características (WHITE et al., 2008).

Diversos casos da enfermidade têm sido relatados em animais e humanos (GROOTERS, 2003; SANTURIO et al., 2006a; KRAJAEJEUM et al., 2008; GAASTRA et al., 2010) nos quais a doença cursa com variável gravidade. O agente *Pythium insidiosum* é um micro-organismo essencialmente aquático (PEREIRA & MEIRELES, 2007), que se reproduz assexuadamente através de zoósporos biflagelados, os quais demonstram quimiotaxia por pêlos, tecidos lesionados de plantas ou animais, com posterior adesão devido a uma glicoproteína secretada na superfície do zoósporo encistado (MILLER, 1983; MENDOZA et al., 1993; GAASTRA et al., 2010). Abrasões cutâneos permitem a fixação e germinação dos zoósporos (RAVISHANKAR et al., 2001; QUINN et al., 2005; PEREIRA & MEIRELES, 2007). Não há predileção por sexo, idade ou raça e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, sem relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e homem (MENDOZA et al., 1996; GAASTRA et al., 2010).

Embora ocorra em todas as regiões do Brasil, no Pantanal brasileiro é considerada endêmica e causa prejuízos significativos a equinocultura (LEAL et al., 2001), pois essa região agrega considerável rebanho de equinos, adaptados aos campos alagados. Pelas características ambientais, estima-se que seja um dos locais de maior incidência de pitiose equina do mundo (MENDOZA et al., 1996; LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a). Embora essa probabilidade seja consistente, não existe até o momento, dado relativo a estudos epidemiológicos na região, sendo este o objetivo do trabalho.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Caracterização do estudo***

Os dados foram obtidos de trinta e quatro propriedades rurais com histórico da doença. A investigação ocorreu em propriedades distribuídas na sub-região de Poconé – Mato Grosso, Brasil, que agrega os municípios de Poconé, Cáceres, Nossa Senhora do Livramento e Santo Antônio do Leverger (SILVA & ABDON, 1998). Adicionalmente, à medida que eram confirmados casos suspeitos em regiões limítrofes, os mesmos eram incluídos no estudo para posteriores comparações. Utilizou-se método descritivo observacional para o estudo de casos em populações de indivíduos sob risco durante o período de 2007 a 2010.

### ***Caracterização da área trabalhada***

O Pantanal Norte é uma região onde as estações são mais definidas que na parte Central e Sul. A chuvosa normalmente se estende de outubro a março, denominada de “verão”. A seca estende-se de abril a setembro, sendo denominada de “inverno”. A precipitação média anual situa-se entre 800 e 1200 mm. O clima é tropical, quente e úmido, do tipo Aw segundo classificação de Köppen, a temperatura média anual é de 25,5°C, com média das mínimas de 20°C no “inverno” e de 32°C nos meses de verão (MORAES et al., 2001). Segundo SOARES et al. (2006), a litologia da região ocorre sob as formas argilosa e arenosa, de modo alternado e descontínuo. Os parâmetros climáticos de regiões limítrofes do bioma Cerrado possuem as mesmas características.

### ***Coleta de dados***

Os casos eram estudados e compilados a partir de informações oriundas do serviço veterinário local público e privados junto a Universidade Federal de Mato Grosso, no período de 2007 a 2010. A partir destas informações, eram realizadas visitas *in loco*

objetivando observação da dinâmica da doença, compilação de dados ambientais e de variáveis individuais, além de coleta das amostras biológicas para validação dos casos.

### ***Das normais climatológicas, distribuição espacial e temporal***

Índices de temperatura e precipitação pluviométrica da região foram obtidos dos valores médios de estações pluviométricas Mestre Padre Bombled da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) e da Fazenda Experimental da mesma Instituição. Dados adicionais foram obtidos também do INMET e CINDACTA. Os valores finais representam médias mensais abrangendo os quatro anos de estudo. A distribuição espacial foi obtida por georeferenciamento dos casos através de GPS portátil com base no Datum SAD 69, de onde se obteve as coordenadas e altitudes. A distribuição temporal dos casos foi obtida pelo conjunto: característica da lesão, escore corporal e informação da primeira observação pelos tratadores.

### ***Da prevalência, mortalidade e letalidade***

A população sob risco para o cálculo de prevalência foi obtida de cortes transversais nos rebanhos na ocorrência de cada caso, relacionado à população exposta, dada à característica migratória e constante comercialização dos animais. Os dados foram sumarizados de um levantamento em 24 propriedades no bioma Pantanal e dez do bioma Cerrado, sendo que três dessas últimas, espacialmente localizadas em ecótonos de transição.

### ***Variáveis individuais***

Foram compiladas as variáveis quanto ao sexo, sendo os animais divididos em machos e fêmeas sem distinção relativas à castração. Quanto à espécie, divididas em equinos e muares. Quanto à raça de acordo com a ocorrência e quanto à idade, dividido em grupos etários de acordo com a arcada dentária: menores que um ano, um a três

anos, três a seis anos, seis a nove anos, nove a 12 anos e acima de 12 anos (adaptado de SILVA et al., 2003). Com relação aos sítios anatômicos foram divididos como unifocais ou multifocais, e agrupados em dois segmentos: axiais, com lesões localizadas na cabeça e tronco e apendiculares, em casos que as lesões localizavam-se nos membros torácicos ou pélvicos. Quanto à pelagem divididos em cinco grupos: castanho, tordilho, baio, alazão e pampa. Quanto à pigmentação do sítio lesional em três: pigmentada, despigmentada e transição (quando a lesão encontrava-se nos limites de áreas cutâneas pigmentadas e despigmentadas e/ou em casos de pelagem composta).

### ***Fatores de inclusão***

Foram investigados casos em que havia lesões cutâneas com características granulomatosas, ulceradas, secretórias (serosanguinolentas), de crescimento rápido (atingindo na primeira semana algo em torno de sete a oito centímetros e em três semanas, diâmetro de 15 a 20 cm), associado a perda de peso. Por vezes em lesões crônicas, eram observados *sinus* em permeio às lesões, de onde se extraíam *kunkers*, massas branco-amareladas semelhantes a corais com dois a dez milímetros de diâmetro, que são concrementos eosinofílicos denominados internacionalmente de *kunkers* (SANTURIO & FERREIRO, 2008). Estas características macroscópicas permitiram diagnóstico presuntivo de pitiose. Amostras sorológicas dos animais acometidos obtidas por venopunção jugular foram testadas para anticorpos específicos anti-*Pythium* pelo ensaio imunoenzimático indireto em fase sólida, no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (SANTURIO et al., 2006b). Mediante prévia autorização do proprietário, foram realizadas biópsias incisionais das lesões. Os animais foram sedados com acepromazina 0,1mg/kg, xilasina 1mg/kg e quetamina 2 mg/kg (NÓBREGA-NETO et al., 2002). Os tecidos colhidos foram fixados em formalina a 10%, processados, incluídos em parafina e cortados com cinco micrômetros de espessura. As colorações empregadas foram a hematoxilina e eosina (HE) e Grocott (PROPHET et al., 1992) no Laboratório de Patologia Veterinária

(LPV) da Universidade Federal de Mato Grosso. Ainda, no LAPEMI, *kunkers* extraídos das lesões foram lavados em água estéril e em seguida semeados em tubos com tampa de rosca contendo Meio Mínimo, Agar Saboraud Dextrose (ASD) e Micosel e, após foram incubados a 37°C, por 48 horas. A identificação considerou características macroscópicas e microscópicas de *P. insidiosum*, além da indução da zoosporogênese (PEREIRA et al., 2007). Adicionalmente, realizou-se caracterização molecular (PCR) nos tecidos afetados, segundo BOTTON et al. (2011), com *primers* específicos para *P. insidiosum*.

Foram incluídos neste estudo, somente animais com perfil clínico compatível, testados positivos sorologicamente (ELISA indireto) e com padrão histológico e histoquímico compatível com pitiose (infiltrado predominantemente eosinofílico por vezes com múltiplas áreas de necrose com reação Splendore Hoespli, imagens negativas tubuliformes semelhantes a hifas e coloração especial de Grocott positiva, observando-se hifas com estruturas ramificadas, ocasionalmente septadas, de coloração enegrecida). As culturas microbiológicas e/ou PCR caracterizaram *Pythium insidiosum* como agente causal.

### ***Análise estatística***

Para o estudo de casos em populações de indivíduos sob risco, durante intervalo de tempo específico (estudo prospectivo) e por tratar-se de doença crônica, adotou-se prevalência como medida de morbidade (PEREIRA, 1995). Os dados por vezes são apresentados de maneira descritiva considerando variáveis qualitativas e quantitativas. Utilizou-se o Programa Epi-info, versão 6.0 (DEAN et al., 2001) objetivando avaliar parâmetros de frequência e porcentagem bem como teste de Qui-quadrado ou Fisher entre associações estudadas em conformidade com as características das variáveis analisadas (SIEGEL, 1975; PETRIE & WATSON, 2009).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 2007 a 2010 foram estudados setenta e seis casos da enfermidade em equídeos nas regiões de abrangência do estudo, envolvendo biomas Pantanal e Cerrado.

A tríade de solo inundável com drenagem lenta, abundância de vegetação aquática e altas temperaturas são locais propícios à proliferação e manutenção do patógeno *Pythium insidiosum* (MILLER & CAMPBELL, 1982; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). Estes ambientes são característicos do bioma Pantanal, no qual se concentrou 85,53% dos casos (65/76). Os outros 14,47% (11/76) foram observados no bioma cerrado ou ecótonos de transição entre os biomas pantanal e cerrado. Da mesma forma, eram verificados no cerrado associação entre acúmulo de água com vegetação aquática abundante e doença, ou seja, formação de baías naturais ou artificiais (açudes) nos quais os equinos tinham acesso. Comportamentalmente, equinos permanecem longos tempos ociosos ou pastando em locais com acúmulo de água, com membros totalmente ou parcialmente submersos (CHAFFIN et al., 1995; SANTURIO et al., 2006a), aumentando desta forma o risco de contato com o patógeno. Os locais de permanência preferidos pelos equinos na região do pantanal são relacionados a campos e áreas abertas, nos quais existe uma alta temperatura ambiente, na faixa ou acima de 30°C (HARSENACK et al., 2003), ideal para manutenção do agente infeccioso. A distribuição espacial das propriedades ocorreu em áreas localizadas no pantanal, 70,59% (24/34), em propriedades no cerrado 20,59% (7/34), por vezes com repetições de eventos e em ecótonos de transição 8,82% (3/34). Notou-se grande variação da prevalência nos biomas. Na região do pantanal os índices variavam de 0,9-66,67%. No Cerrado entre 2,17-33,33%. As altitudes variaram no pantanal entre 80 e 168m e no cerrado entre 178 e 323m. Não há uma distribuição regular dos casos nos rebanhos em consecutivos anos. Isto pode ser devido ao manejo dos animais em algumas situações, com migração de área, influenciado, também, por índices variáveis de precipitações pluviométricas. De um modo geral, considerando o

número total de animais expostos, a prevalência nos dois biomas situa-se em torno de 5% (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil epidemiológico de pitiose cutânea em equídeos (2007-2010), em propriedades rurais nos biomas Pantanal Matogrossense e Cerrado, Brasil.

BIOMA	EQUÍDEOS						
	PROPRIEDADES	TOTAL DE EXPOSTOS	CASOS	ÓBITOS*	PREVAL (%)	MORTAL (%)**	LETAL (%)**
PANTANAL	24	1201	65	15	5,41a*	1,25	23,08
CERRADO	10	216	11	5	5,09 <sup>a</sup>	2,31	45,45
TOTAL	34	1417	76	20	5,36	1,41	26,32

PREVAL – prevalência MORTAL - mortalidade LETAL – letalidade

\*Letras minúsculas iguais nas colunas indicam que não houve diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade  $RP=1,06$  (0,57; 1,98)  $p=0,8478$

\*\*Parâmetros subestimados devido intervenção (tratamento) em um grupo de animais por imunoterapia (Pitium Vac®) e ou cirurgia nos dois biomas

O fato de não haver diferença estatística entre regiões pode estar relacionado à proximidade geográfica e bioclimática das mesmas, associado ao comportamento do equino em procurar permanecer em locais com acúmulo de água. Ressalte-se que os parâmetros mortalidade e letalidade, ficaram prejudicados dada a utilização de imunoterapia e/ou associação com cirurgia em alguns animais, principalmente no pantanal, tornando esses índices subestimados. Sendo assim, os índices de mortalidade e letalidade nas regiões corresponderam a 1,25-23,08% (pantanal) e 2,31-45,45% (cerrado), respectivamente. A Tabela 6 apresenta 62 casos de forma estratificada, relacionando o número de animais não tratados ou submetidos a diversos tratamentos empíricos (associados a corte e cauterização com ferro candente), nos quais a letalidade chegou a 73,33%. Não foi possível fazer o acompanhamento de 13 casos, e, um animal se acidentou no curso do tratamento. A enfermidade se não tratada, leva a morte na grande maioria dos casos (LEAL et al., 2001; SANTURIO et al. 2006a). Não houve diferença significativa entre os animais submetidos a tratamentos

imunoterápicos ou associados, porém foi altamente significativo comparando tratados e não tratados, indicando que a utilização da imunoterapia pode diminuir as perdas econômicas, principalmente em abordagens precoces.

Tabela 6. Demonstrativo do desfecho de animais com pitiose cutânea (2007-2010), tratados ou não, oriundos de propriedades rurais nos biomas Pantanal Matogrossense e Cerrado, Brasil.

<b>PITIOSE</b>				
TRATAMENTO	CURA	ÓBITO OU DISFUNÇÃO	TOTAL	EFICÁCIA
IMUNOTERAPIA*	27	7	34	79,41 <sup>a</sup>
ASSOCIADO**	11	2	13	84,62 <sup>a</sup>
NÃO TRATADOS	4	11	15	26,67 <sup>b</sup>
TOTAL	42	20	62	

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam que existe associação estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $X^2_{\text{calc}} = 15,39$   $p < 0,00045$ ) relativo ao desfecho entre tratados e não tratados. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa relativo ao tipo de tratamento (Teste exato de Fisher;  $p = 0,352$ )

\* Pitium Vac®

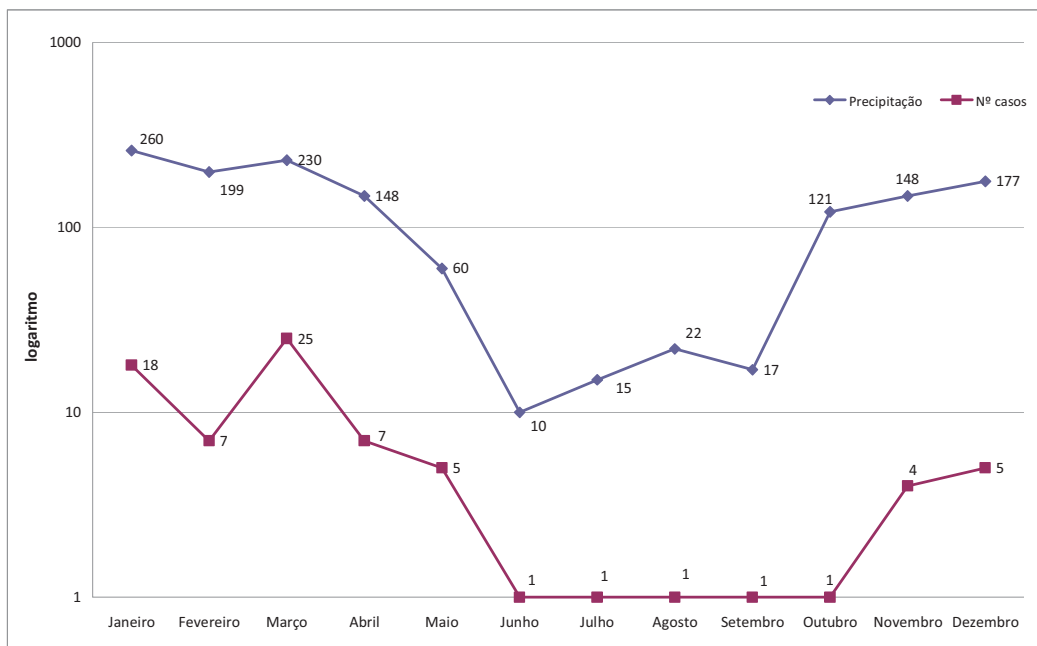
\*\*Associado refere-se a tratamento cirúrgico em conjunto com imunoterápico

No pantanal a prevalência foi maior em solos argilosos, já no cerrado variou entre arenosos e argilosos, relacionados a solos compactados e conseqüente acúmulo de água e vegetação aquática. Cabe ressaltar que no Pantanal, existe uma planta chamada *Solanum glaucophyllum* que se distribui somente nos solos argilosos (POTT & POTT, 1994; TOKARNIA et al., 2000), considerando variada litologia da região, ou seja, áreas de solos ora argilosos, ora arenosos ou mistos (SOARES et al., 2006). Normalmente onde se verificavam casos, a planta de habitat palustre, favorecida pelo excessivo alagamento, estava presente. A principal relação dessa presença é a

drenagem lenta do aporte hídrico, característico de solos argilosos. Assim, a planta se torna um importante marcador ambiental em avaliação de risco, considerando sua distribuição nos locais com acúmulo de água e consequente proliferação de plantas aquáticas, ambiente favorável ao patógeno.

A distribuição temporal está expressa na Figura 15, e foi ascendente de outubro a março, com os maiores picos nos meses de janeiro e março, período de maior índice pluviométrico na região, declinando no período de estiagem (abril a setembro).

Figura 15. Média das precipitações anuais (em mm) em sub-região do Pantanal Matogrossense e áreas limítrofes e distribuição temporal dos casos de pitiose cutânea em equídeos com relação aos meses do ano (2007-2010)



$$R^2=0,7748$$

Fonte: médias das estações pluviométricas Mestre Padre Bombled (Cuiabá) e Fazenda Experimental da UFMT (Santo Antônio do Leverger)

Obs.: Devido a diferença na escala dos valores e objetivando trabalhar a proporcionalidade, optou-se pelo demonstrativo em escala logarítmico no eixo Y. A precipitação está expressa em mm; os casos, expressos em números absolutos.

Segundo LEAL et al. (2001) no Pantanal Sul o ápice das cheias, entre fevereiro e maio, corresponde ao período de maior concentração de casos. Convém lembrar, que as cheias na região Sul são mais tardias e relacionadas também ao escoamento lento da região Norte para Sul, deslocando assim a concentração de casos naquela região. Dessa forma, no Pantanal Norte e Sul, a ocorrência sazonal de maior número de casos no período chuvoso, dá origem ao nome popular “ferida da moda”. MENDOZA et al. (1996) na Índia, relatam ocorrência em verões chuvosos (origem do termo ‘bururs’-ferida da chuva) e na Austrália no verão com altas temperaturas, precedido de acúmulo de água em inverno chuvoso. A linha de emergência da doença no Pantanal Norte logo após a emergência do início do período chuvoso, com picos seguindo a mesma tendência temporal, sugere período de incubação curto, em torno de 15 a 30 dias, indo de encontro às suspeitas do período estimado de 3-4 semanas que transcorre entre o primeiro contato com o patógeno e o desenvolvimento das lesões, estimado por MENDOZA (1987) e ainda desconhecido (PEREIRA & MEIRELES, 2007).

Com relação ao sexo foram acometidos 30 machos (39,48%) e 46 fêmeas (60,53%), não havendo diferença significativa.

Dentre as espécies acometidas verificou-se o predomínio de casos nos equinos – 74 (97,37%) a despeito dos muares – 02 (2,63%). Apesar da discrepância, não há, também, indicação de predisposição neste contexto, sendo que esta diferença pode estar relacionada à predominância da primeira espécie na região de Poconé. Segundo o IBGE cidades, no censo agropecuário de 2006, a população de equídeos dessa região girava em torno de 6262 equinos (96,2%) e 239 muares (3,8%). Considerando as devidas proporções das espécies nessas populações e a proporção amostral de casos, provavelmente ambas sejam igualmente susceptíveis ao patógeno.

Relativamente à raça, 41 animais eram SRD (53,95%), 34 eram da raça Pantaneira (44,74%) e um da raça Painthorse (1,31%). Da mesma forma a concentração de casos em animais mestiços ou da raça Pantaneira, devem-se a adaptação e conseqüente predomínio deste grupo racial nos campos alagados, considerando que praticamente 90% dos casos objeto do levantamento ocorreram na região do Pantanal Matogrossense. Equinos da raça Pantaneira segundo REZENDE et al. (2001) surgiram

por seleção natural na área central do estado de MT, em áreas alagadas. A maioria dos cavalos no Pantanal é remanescente do cavalo Pantaneiro ou mestiços resultantes de cruzamentos indiscriminados com outras raças, que conseguiram se adaptar as condições bioclimáticas (SANTOS et al., 1995). O animal da raça Painthorse, foi acometido no bioma Cerrado. Assim, a frequência relativa à raça, também, não indica predisposição.

Houve associação entre a idade e prevalência da doença. Dos animais avaliados, com idade estimada pela arcada dentária, verificou-se um predomínio de ocorrência em animais adultos, a despeito de animais jovens com menos de um ano de idade. De acordo com a Tabela 7, a prevalência da pitiose em animais acima de um ano foi 8,07 vezes a observada nos animais abaixo de um ano, nas mesmas condições de exposição (teste Qui-Quadrado=6,48; valor  $p=0,0109$  e Intervalo de Confiança a 95% de 1,13-57,75). Embora a enfermidade possa afetar animais em qualquer idade, na espécie equina é significativamente mais frequente em animais adultos.

Tabela 7. Variação da idade (adultos e jovens) de equinos relativa ao desenvolvimento de pitiose cutânea (2007-2010) oriundos de propriedades rurais nos biomas Pantanal Matogrossense e Cerrado, Brasil

<b>PITIOSE CUTÂNEA</b>				
ESPÉCIE	SIM	NÃO	TOTAL	RISCO / RISCO RELATIVO
> QUE 1 ANO	75	1204	1279	75/1279 <sup>RA</sup>
< QUE 1 ANO	01	137	138	1/138 <sup>RJ</sup>
<b>TOTAL</b>	<b>76</b>	<b>1341</b>	<b>1417</b>	<b>8,09<sup>RP</sup></b>

RA = Risco A (acima de 1 ano), RJ = Risco J (abaixo de 1 ano), RP = Razão de Prevalência. Teste Qui-Quadrado;  $\chi^2_{\text{calc}}=6,48$ ; Intervalo de Confiança a 95% (1,13-57,75).

Esta observação é concordante com a maioria dos relatos que enfocam a enfermidade em caráter coletivo (SANTOS et al., 1987; ALFARO & MENDOZA, 1990; SALLIS et al., 2003; HEADLEY & ARRUDA JÚNIOR, 2004; FREY JÚNIOR et al., 2007, LÖFF et al., 2010) ou relato de caso individual (LUVIZARI et al., 2002; MACIEL et al., 2008; BEZERRA JÚNIOR et al., 2010). Embora em levantamentos com maior amplitude de casos a idade não é apontada precisamente, o fato de ser pouco relatada em animais com menos de um ano chama a atenção, pois segue o mesmo padrão dos sarcoides, e vai de encontro às observações de ROONEY & ROBERTSON (1996), SCOTT & MILLER JR (2003), SALGADO et al. (2008), BRUM et al. (2010) em que relatam que casos de sarcoides são comuns antes dos sete anos e raro antes de um ano de idade. A tabela 8 demonstra essa distribuição.

Tabela 8. Distribuição de 76 casos de pitiose cutânea em equídeos de acordo com a idade (2007-2010) em sub-região do Pantanal Matogrossense e áreas limítrofes.

IDADE	NÚMERO ABSOLUTO	NÚMERO RELATIVO (%)	% ACUMULADO
0-1	1	1,31	1,31
1-3	21	27,63	28,94
3-6	38	50	78,94
6-9	10	13,16	92,1
9-12	3	3,95	96,05
12-16	3	3,95	100

Ressalta-se que em recente estudo comparando espécies susceptíveis nas mesmas condições de exposição, a situação se inverte em bovinos, nos quais, a pitiose se manifesta mais frequentemente em bezerros com menos de um ano, com alguns registros em animais até 18 meses. Cabe ainda ressaltar, que a baixa frequência em animais jovens, pode relacionar-se a menor risco por conta de exposição única, ou seja, os adultos, à medida que a idade avança, tendem a se expor repetidamente a cada

ano, quando de novo ciclo das águas, aumentando assim, a probabilidade de se infectarem.

Quanto à apresentação, predominou a forma unifocal, 78,95% (60/76). A multifocal, 21,05% (16/76), ocorreu com sítios anatômicos distribuídos em membros torácicos e pélvicos, por vezes em região peitoral e membros, e abdômen e região peitoral. Este achado foi concordante com a maioria dos relatos que descreve apenas uma lesão em cada animal, podendo, porém, existir lesões multifocais (MILLER & CAMPBELL, 1982; MENDOZA & ALFARO, 1986; LEAL et al. 2001; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010).

A distribuição das lesões predominou sob a forma apendicular, 76,32% (58/76), seguida das axiais, envolvendo principalmente tronco (regiões peitoral e abdominal ventral), 22,37% (17/76), e com um único caso localizado na região facial, 1,32%. A maior frequência de lesões em membros e abdômen ventral está de acordo com a maioria dos relatos, devido ao contato de áreas lesadas com águas contaminadas por zoósporos, forma infectante do oomiceto (MILLER & CAMPBELL, 1982; CHAFFIN et al., 1995; LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). Mais uma vez guarda semelhança com a distribuição dos sarcoides que são frequentes, seguindo a ordem decrescente, em membros, troncos e região cervical (WHITE et al., 2002; SALGADO et al., 2008; BRUM et al., 2010). Considerando a necessidade de lesão prévia, relativa à entrada de patógenos em ambas as entidades nosológicas (sarcoide e pitiose), por vezes seguindo praticamente as mesmas distribuições nos sítios anatômicos, pode-se supor algum fator predisponente comum as mesmas. Este achado chama atenção, pois os sítios lesionais descritos, correspondem a regiões anatômicas preferidas por dípteros para o repasto sanguíneo (FRANÇA, 1975; BASSI et al., 2000). Baseado nesse pressuposto surge a hipótese da possível associação da pitiose com vetores. A Figura 16 ilustra essa probabilidade, demonstrando áreas corpóreas lesionadas, correspondendo com áreas preferenciais parasitadas por *Tabanidae* (segundo BASSI et al., 2000). Destarte, essa assertiva, ou mesmo a ilustração a seguir, trata-se apenas de uma hipótese e como tal, deve ser testada à luz de criteriosa investigação científica.

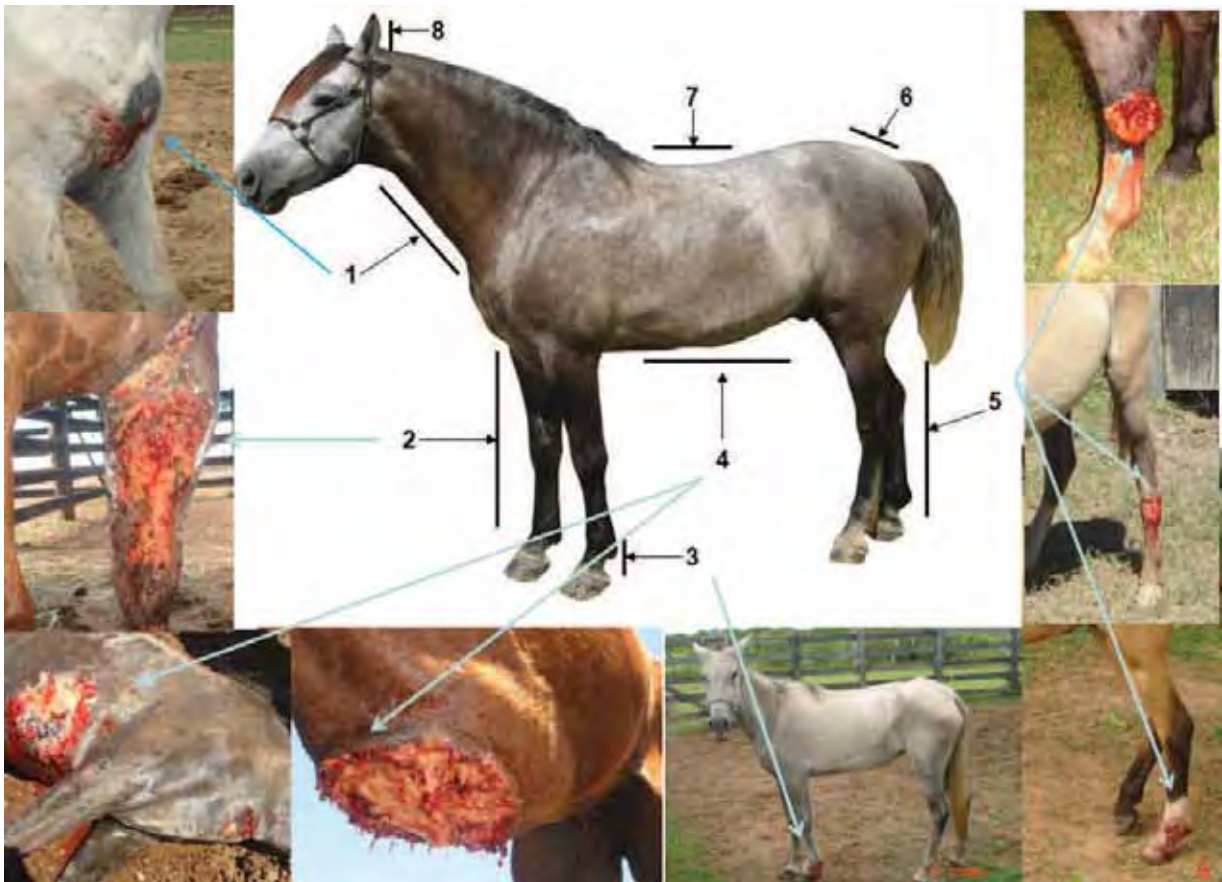


Figura 16. Ao centro, sítios anatômicos de cavalos preferidos por diferentes espécies de *Tabanidae* para hematofagia, segundo Bassi et al. (2000). Observar distribuição das lesões de pitiose, apresentando correspondência com as áreas de parasitismo.

Quanto à cor da pelagem, os cavalos de pelagem castanha foram mais acometidos, 34,21% (26/76), seguida da baia, 26,32% (20/76), tordilha, 19,74% (15/76), alazã, 14,47% (11/76) e por último a pampa, 5,26% (4/76). Nenhum relato anterior enfatizou pelagem, porém, neste levantamento observou-se maior frequência de casos em animais que agregam cores mais escuras. Este aspecto é também relevante, afinal alguns autores afirmam que dípteros além de certas regiões anatômicas preferenciais, também preferem parasitar equinos de cores mais escuras como castanho (FRANÇA, 1975; BASSI et al., 2000). Assim, atentou-se para a pigmentação dos sítios anatômicos acometidos e verificou-se o maior acometimento de áreas de coloração mais escuras ou pigmentadas, 73,68% (56/76), a despeito das despigmentadas, 15,79% (12/76). Este fato foi notório em animais de pelagem composta, como os pampas, onde os sítios

lesionais ocorreram na área pigmentada ou de transição 10,53% (8/76). Obviamente há necessidade de mais estudos, uma vez que este tipo de pelagem é menos frequente. Ainda, em levantamento acerca da pelagem nos cavalos pantaneiros ou mestiços de campos alagados, a pelagem tordilha foi apontada como a mais frequente (SANTOS et al., 1995). A figura 17 ilustra o achado relativo à pigmentação.



Figura 17. Sítios anatômicos de equinos acometidos por pitiose cutânea. Observar sítios de ocorrência da lesão em áreas pigmentadas ou de transição.

Os estudos de BASSI et al. (2000) corroboram esta hipótese, pois o autor estudando o comportamento de tabanídeos verificou que em animais pampas, os insetos pousavam sobre manchas escuras com maior frequência para repasto. Ao que parece, os sítios anatômicos de lesão não são aleatórios, pelo contrário, são uniformes e podem correlacionar-se não somente ao contato de injúrias cutâneas com águas contaminadas, como também a áreas de pele constantemente lesada pelos dípteros no ato da hematofagia.

Diversos aspectos norteiam a hipótese da participação dos tabanídeos na cadeia epidemiológica da pitiose. Curva de aumento populacional desses vetores no início das chuvas relacionando-se sazonalmente com altas temperaturas e índices pluviométricos, alta prevalência do inseto nas áreas de ocorrência da doença, além de áreas anatômicas coincidentes com as lesões são algumas delas. Isto gera a hipótese de que esses vetores possam desempenhar importante papel na epidemiologia da pitiose, em duas vertentes: a primeira, albergando e transmitindo o patógeno de forma direta, considerando que as larvas dos dípteros desenvolvem-se sob altas temperaturas em

ambientes úmidos e alagados, junto a folhas e detritos vegetais (AHID, 2009), microambiente favorável, também, a *Pythium insidiosum* (MENDOZA et al., 1993). Há relatos de isolamento do agente em lesão decorrente de picada de aranha em humano (RAVISHANKAR et al., 2001), além do recente isolamento do patógeno da larva de um mosquito na Índia, pressupondo que o oomiceto pode ter habilidade de infectar vetores, especialmente em regiões tropicais, onde mosquitos têm alta prevalência (GAASTRA et al., 2010). A segunda, de forma indireta, pela constante espoliação, promovendo porta de entrada ao patógeno associando diversas microlesões decorrentes das picadas a ambientes alagados. Corroboram esta hipótese, a indicação de alguns autores sugerindo que lesões decorrentes de picadas de insetos podem ser portas de entrada (MENDOZA et al., 1993; REES, 2004), devendo ser consideradas como importante ponto epidemiológico (SCHURKO et al., 2003). Cabe ressaltar ainda, que segundo SILVA (2009), micro-organismos patogênicos que são transmitidos por insetos hematófagos, podem ser favorecidos pelas ações anti-hemostáticas e imunomoduladoras da saliva, através da regulação da resposta imune do hospedeiro. Os constituintes salivares potencializam os eventos infecciosos, instruem ciclos de transmissão de patógenos aos animais e ao homem, incluindo linfócitos T, atualmente, um dos principais focos de estudo da cura ou mecanismos de evasão do *Pythium insidiosum* relativo ao hospedeiro equino.

As áreas onde as lesões são frequentes correspondem às regiões peitoral, axilar, média distal dos membros, virilha e face. Imagens termográficas indicam que essas áreas do corpo correspondem a zonas corpóreas mais quentes, detectáveis a termografia (MOURA et al., 2011). Essas áreas, pelo calor, requisito essencial para *P. insidiosum* ativar produção enzimática, podem explicar a rápida expansão das lesões nesses sítios anatômicos. O patógeno depende de enzimas para determinar pressão invasiva em tecidos íntegros, conforme comprovado em estudos *in vitro* (RAVISHANKAR et al., 2001; DAVIS et al., 2006). Convém lembrar, que nas áreas apontadas a temperatura corpórea fica em torno de 37°C, temperatura ótima para crescimento do oomiceto, segundo DE COCK et al. (1987). Os dois parâmetros (crescimento/produção enzimática) ocorrendo de forma sinérgica podem incrementar

velocidade de injúria cutânea. A figura 18 relaciona as áreas aludidas, com lesões de rápida expansão.



Figura 18. Imagens de sítios anatômicos cutâneos comumente afetados por pitiose, caracterizados por lesões de rápida expansão, correspondendo a áreas corpóreas com temperaturas mais elevadas (ilustração das imagens termográficas - Armando López Guerrero e Tatiana Figueiredo).

As lesões de modo geral apresentaram-se ulceradas, de rápido crescimento, associado à formação de extenso tecido de granulação de acordo com relatos de outros autores (SANTOS et al., 1987; ALFARO & MENDOZA, 1990; SALLIS et al., 2003; HEADLEY & ARRUDA JÚNIOR, 2004; FREY JR et al., 2007; LÖFF et al., 2010). À medida que as feridas cronificavam, era possível verificar *sinus* de onde se extraía *kunkers*, que aumentavam proporcionalmente em número e tamanho, conforme evolução das lesões e concentravam-se principalmente nas bordas. Essas estruturas são constituídas por vasos sanguíneos, hifas de *P. insidiosum* recobertas por células necróticas (CHAFFIN et al., 1995; MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010) e relacionadas ao mecanismo de evasão da resposta imune. Mesmo sendo antigênicas, as hifas não são reconhecidas pelo sistema imune, devido a marcante ação inflamatória (MILLER, 1981).

A evolução entre apresentação e desfecho (óbito / disfunção ou eutanásia) nos animais não tratados variou entre dois e sete meses. Um animal demonstrou lesão quiescente, com mais de um ano de evolução, conforme descrito por LEAL et al. (2001), embora, ainda drenasse secreção serossanguinolenta expelindo *kunkers*.

Provavelmente, cursos clínicos mais curtos e fatais, por vezes associados à co-infecções, tais como anemia infecciosa equina, tripanossomíases, conidiobolomicose e infecções bacterianas secundárias, enfermidades, também de caráter consuntivo, podem ter contribuído para evolução mais rápida relativa ao óbito. Em algumas ocasiões, animais em avançado estado de pauperante, com ou sem co-infecção detectável, morreram após inversão térmica. Denominado regionalmente por 'friagem', é fenômeno conhecido na região, mas cuja característica é pouco explicada, com ampla amplitude de variação do gradiente térmico em campos abertos (HARSENACK et al., 2003), local de permanência dos animais. Por certo, anemia crônica, hipoproteinemia e déficit energético nos animais acometidos, comuns em infecções fúngicas crônicas (DIAL, 2007), diminuem a resistência quanto a estas mudanças bruscas de temperatura, evento climatológico comum na planície pantaneira nos meses de seca, fator determinante do óbito. Hipotermia, decorrente de inversão térmica é apontada como causa de mortalidades em bovinos, na forma de surtos, com baixo escore corporal (COLODEL et al., 2006; LEMOS & RIET-CORREA, 2007).

O eficiente mecanismo de evasão de *P. insidiosum* no hospedeiro equino determina frágil imunidade inata e adquirida, haja vista a evolução crônica da doença, frequência em animais adultos, por vezes senis, e até mesmo reinfecções (LEAL et al., 2001). Durante o estudo, reinfecções foram verificadas em diferentes sítios lesionais, ocorrendo em três animais tratados empiricamente por exérese e cauterização, com intervalos de nove meses a um ano da primoinfecção, e em seis animais tratados com imunoterápicos após dois a quatro anos do primeiro evento. O fato demonstra que mesmo após desenvolver doença clínica e tratamento por imunoterapia, a resposta imune embora tenha se prolongado, após certo período, declina e não é protetora frente a outro desafio (SANTURIO et al., 2006a, GAASTRA et al., 2010).

Ao que parece, embora equinos não participem diretamente da transmissão em caráter zoonótico, podem prover manutenção e viabilidade do ciclo de vida do *Pythium insidiosum* nas regiões de ocorrência, especialmente no pantanal brasileiro, quando as condições ecoambientais tornam-se ciclicamente adversas ao patógeno, por conta de longos períodos de estiagem associado por vezes a quedas bruscas de

temperatura ambiente. Como eventos de cheia e seca ocorrem de maneira cíclica, longos períodos de seca inviabilizariam a manutenção do agente, partindo do pressuposto de que o micro-organismo é essencialmente aquático (PEREIRA & MEIRELES, 2007) e que ciclos sexuais ocorrem com participação de plantas aquáticas (MILLER & CAMPBELL, 1982; MENDOZA et al., 1996; SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). *P. insidiosum* está adaptado a diversas espécies de mamíferos com patogenicidade diferenciada (GAASTRA et al., 2010) e provavelmente, na evolução e seleção natural, encontrou no hospedeiro equino uma forma de se perpetuar, determinando nestes uma doença debilitante, crônica, formando *kunkers*, estruturas que promovem evasão da resposta imune pela marcante ação inflamatória (MILLER & CAMPBELL, 1982) e que, por sua vez são eliminadas periodicamente através dos *sinus* lesionais, fato que associado ao aspecto comportamental do hospedeiro equino, que procura pastar ou permanecer ocioso em lagoas e locais de acúmulo de água, favorece a eliminação dessas estruturas em ambientes aquáticos, dando assim continuidade ao ciclo. Dá consistência a essa hipótese, o fato de que *kunkers* apresentam habilidade em gerar zoósporos, sugerindo que estas estruturas ao se desprenderem das lesões nos ambientes alagados auxiliam na manutenção do ciclo do patógeno, conforme demonstrado por CÔRREA et al. (2009) em estudos preliminares. Assim, a evolução crônica em torno de cinco a sete meses ou mais, promove a sobrevivência do patógeno no hospedeiro equino, durante o período de estiagem, condição bioclimática adversa a manutenção do ciclo sexual.

Apesar de não existir padronização de testes para a espécie equina, dados preliminares investigados não indicam susceptibilidade da espécie equina, correlacionada a alterações da hemoglobina (SANTOS et al., 2010) tal como ocorre em humanos na Tailândia, onde são acometidos indivíduos predominantemente talassêmicos (KRAJAEJUM et al., 2006). A relação da predominância dos casos naquela população, pode ser devido à avididade do patógeno pelo ferro, mineral que se encontra elevado em pacientes talassêmicos em decorrência da constante hemólise (SANTURIO & ZANETTE, 2011 – comunicação pessoal). Essa observação vai de encontro à baixa prevalência em equinos jovens, nos quais o nível de ferro é menor se

comparados a adultos (HARVEY et al., 1987), provavelmente diminuindo por essa razão, a susceptibilidade de equinos menores de um ano de idade ao patógeno. Vale ressaltar, que na região do Pantanal, estudos acerca da composição de gramíneas e solos, não indicam inclusão de ferro em suplementações minerais direcionadas a equinos, considerando presença em quantidade excessiva nas forragens e conseqüentemente nos animais que as consomem (SANTOS, 1997). Assim, os dados desse estudo permitem inferir que pode existir predisposição nos equinos relativa à idade, pelagem, além de provável participação de vetores na cadeia epidemiológica de *P. insidiosum*.

## **CONCLUSÕES**

Esse levantamento epidemiológico no Pantanal Matogrossense foi um estudo pioneiro, comprovando de fato, expressiva prevalência da doença. Importantes hipóteses foram levantadas, embora novos estudos sejam necessários para melhor compreender a dinâmica da doença nas populações expostas a essas áreas de risco. Ainda, os maiores índices pluviométricos registrados incrementaram a incidência da enfermidade, apresentando alta correlação e muito embora ocorram casos esporádicos no período de estiagem, estes se relacionam ao comportamento do equino em permanecer ocioso ou pastando em locais que acumulam água, como baías ou lagoas, ambientes favoráveis a permanência e propagação do patógeno *P. insidiosum*.

## CAPÍTULO 5 - CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PITIOSE CUTÂNEA EM EQUIDEOS DO PANTANAL NORTE, BRASIL

### RESUMO

Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico da pitiose em equideos é relatado em três rebanhos distribuídos no Pantanal Norte de Mato Grosso. O diagnóstico de pitiose foi confirmado por exames patológicos e sorológicos. Animais enfermos foram submetidos à imunoterapia como tratamento base. O monitoramento dos casos tratados de pitiose foi realizado por um período de três anos. Os dados clínicos e epidemiológicos em sua maioria apresentam similitude com outras regiões. De um total de dez animais tratados, a imunoterapia se mostrou eficaz na cura cabal de 70% dos casos e associando à cirurgia em 90%, sendo uma alternativa de tratamento exequível em animais de campo.

**Palavras-chave:** imunoterapia, Pantanal, pitiose.

### INTRODUÇÃO

A pitiose, “swamp cancer”, provocada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* causa geralmente lesões em equinos e outros animais, incluindo, também, humanos. Os zoospóros vivem na água, junto às folhas e detritos vegetais. A doença é conhecida na Colômbia como “espúndio equino” e no Brasil como “ferida brava” e “mal dos pântanos” (LACAZ et al., 2002). Ainda, nos Pantanaís Norte e Sul como “ferida da moda” (SANTURIO et al., 2004).

A região do Pantanal é uma planície inundável de aproximadamente 140.000km<sup>2</sup>, situa-se na região Centro-Oeste do Brasil e figura como a maior área úmida do mundo (SILVA & ABDON, 1998). Nesta região a enfermidade é um dos gargalos que determina perdas econômicas de grandes proporções em equinos, pois se não diagnosticada a

tempo de promover terapêutica adequada, pode evoluir desfavoravelmente e segundo LEAL et al. (2001) culmina com óbitos dos animais infectados.

Em equinos *P. insidiosum* causa lesões cutâneas granulomatosas e ulcerativas de caráter progressivo, localizadas mais frequentemente na porção distal dos membros e em menor escala, na região toracoabdominal ventral, peitoral e cabeça (CHAFFIN et al., 1995; LUVIZARI et al., 2002; FREI JR. et al., 2007; GESCON et al., 2008).

Este trabalho tem como objetivos descrever os aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da pitiose em equinos da região do Pantanal Norte, Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Trata-se de estudo prospectivo da pitiose em 11 equídeos distribuídos em três propriedades rurais do município de Poconé, Pantanal Norte de Mato Grosso, durante três ciclos de alagamento (2007 a 2009).

O acompanhamento dos animais foi executado a cada 14 dias, nos primeiros quatro meses, seguido de uma vez ao mês até seis meses e a cada seis meses totalizando 36 meses.

Para validação dos casos suspeitos, utilizou-se de testes sorológicos imunoenzimáticos e ou biópsias incisionais das lesões. Para realização das biópsias os animais foram previamente sedados com acepromazina 0,1mg/kg e xilasina 1mg/kg. Os tecidos colhidos foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina e cortados com cinco micrômetros de espessura. As colorações empregadas foram a hematoxilina e eosina (HE) e prata-metanamina (GMS) (PROPHET et al., 1992) ou imunoistoquímica, realizada no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Mato Grosso e utilizou-se, método streptavidina-biotina marcada (LSAB) de acordo com BROWN et al. (1988) e GIMENO et al. (1999), com anticorpo primário policlonal anti-*Pythium insidiosum* produzido em coelho e processado pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI).

Amostras de sangue, para obtenção de soro, foram colhidas por punção da veia jugular, utilizando-se agulhas hipodérmicas 40x12 mm. A pesquisa de anticorpos

específicos anti-*Pythium*, no soro dos equinos, foram realizadas pela técnica ELISA indireto (SANTURIO et al., 2006b) junto ao LAPEMI da Universidade Federal de Santa Maria.

Após confirmação da infecção pelo *Pythium* por uma ou ambas as técnicas preconizadas (ELISA e/ou histopatologia), dez animais foram submetidos à imunoterapia (Pitium-Vac®) com produto patenteado pelo LAPEMI/UFSM através de aplicações subcutâneas, a intervalos de 14 dias. Não sendo responsivo até a quinta aplicação (cerca de dois meses e meio de tratamento) associava-se a excisão cirúrgica parcial da área comprometida, seguida de mais três aplicações do imunoterápico, respeitando-se o mesmo intervalo de tempo. Devido ao adiantado estado de gestação, em uma égua, não foi realizada a biópsia, sendo o diagnóstico presuntivo de pitiose baseado nos aspectos epidemiológicos, clínicos e macroscópicos das lesões, além da presença de anticorpos séricos anti-*Pythium* (ELISA). Um dos animais estudados não foi tratado devido à senilidade, acentuada debilidade e estágio avançado de evolução da doença (acima de nove meses).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na tabela 9 são apresentados os perfis dos equídeos e a evolução dos casos de pitiose cutânea, em três propriedades no Pantanal Norte, Mato Grosso, Brasil, durante o período de 2007 a 2009. Observaram-se lesões suspeitas de pitiose em equídeos machos e fêmeas, com idades entre 18 meses a 16 anos. Os equinos afetados eram sem raça definida (5) e da raça Pantaneira (5). Um caso foi observado em muar.

A maior frequência de ocorrência de pitiose em equinos no Pantanal Norte de Mato Grosso concentrou-se nos animais mestiços e da raça Pantaneira. LEAL et al. (2001) afirmam não existir predisposição envolvendo raça, idade ou sexo no desenvolvimento da doença. Possivelmente este achado justifica-se pela adaptação e dominância populacional destes animais nos campos alagados da região.

Tabela 9. Demonstrativo do perfil de equídeos acometidos por pitiose cutânea e evolução em três propriedades no Pantanal Norte ( 2007 a 2009).

Perfil animal			Perfil lesão			Perfil terapêutico	
Espécie	Idade (anos)	Sexo	Local	Apresentação	Tempo de evolução (dias)	Tratamento - N° doses	Evolução
Equina	2,5	Macho	Membro	Única	45	A-3	Cura
Equina	1,5	Macho	Membros	Múltipla	60	B-6	Cura
Equina	2	Fêmea	Membro	Única	21	A-6	Cura
Equina	6	Fêmea	Abdômen	Única	15	A-2	Cura
Equina	3,5	Macho	Membro	Única	90	B-8	Cura
Equina	3	Fêmea	Membros	Múltipla	30	A-2	Cura
Equina	16	Fêmea	Períneo membros	Múltipla	270	C	Óbito
Equina	9	Macho	Membros	Única	180	A-6	Cura
Muar	5	Fêmea	Membro Tórax	Múltipla	↑360 90	A-5	Óbito
Equina	2	Fêmea	Membro	Única	45	A-5	Cura
Equina	3	Fêmea	Membro	Múltipla	7	A-3	Cura

- A- Somente imunoterapia  
 B- Imunoterapia associada a exérese cirúrgica  
 C- Não tratado

Com base nas normais climatológicas do INMET (2009) para a área em estudo, verificou-se que três casos de pitiose ocorreram no início da estação chuvosa (novembro a dezembro) e oito casos, ocorreram no auge do período chuvoso (janeiro a março). A concentração dos casos de pitiose foi semelhante aos ocorridos em outras regiões (LEAL et al., 2001), ou seja, foi igualmente distribuída no ápice das cheias,

condição climática propícia que favorece o incremento do micro-organismo no meio ambiente.

A temperatura ambiente nesses períodos variou de 28 a 36°C. Para a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e acúmulo de água em banhados e lagoas (MILLER & CAMPBELL, 1982). Estas características climáticas e ambientais são praticamente constantes na região do Pantanal Norte de Mato Grosso, incrementando obviamente o número de casos na população susceptível lá existente.

Nas propriedades havia diversos locais formando lagoas de drenagem lenta e com vegetação abundante onde equídeos permaneciam com frequência. A evolução das lesões quando da abordagem, variou entre sete dias a 15 meses. Em duas propriedades onde ocorreu a maioria dos casos (9), os rebanhos concentravam-se em solos argilosos. Embora seja necessária amplitude maior de estudos em outros ambientes, a hipótese de este tipo de solo favorecer ou incrementar a emergência da doença pode relacionar-se ao fato de que normalmente estes solos são pouco permeáveis à água, favorecendo desta forma o acúmulo da mesma e aumento de vegetação aquática, substratos ideais para proliferação do oomiceto, produzindo zoósporos móveis que segundo SANTURIO et al. (2006a) constituem-se na forma infectante do *P. insidiosum*.

Tecido de granulação associado ao *P. insidiosum* atingem diâmetros de 15 cm em média de duas a três semanas, sendo o crescimento progressivo e rápido, porém, de forma mais lenta quando as lesões tornam-se maiores que 30 cm. Os animais, a exceção de um (que morreu após a abordagem clínica), demonstravam segundo informações, estado geral satisfatório no início do processo, porém, seguia-se perda de peso conforme as lesões evoluíam. Em todos os casos se notou prurido e automutilação e em dois havia claudicação. As lesões concentravam-se predominantemente nos membros, a maioria de localização distal. Estas se caracterizavam por lesões cutâneas de rápida evolução, ulceradas, com abundante secreção serosanguinolenta e prurido, por vezes encontrando-se *kunkers* nos *sinus*, esporadicamente ejetados através de pressão digital. A localização das lesões, bem

como, os aspectos morfológicos, ocorreu em conformidade com LEAL et al. (2001), SALLIS et al. (2003) e FREY JR. et al. (2007).

Os aspectos histopatológicos eram homogêneos, predominando, ao redor de áreas necróticas, infiltrados de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares com proliferação de tecido conjuntivo fibroso e neovascularização. Estruturas semelhantes a hifas foram visibilizadas, no interior dos focos necróticos. Os contornos das hifas tinham marcação enegrecida na impregnação pela prata (método de Grocott), estas estruturas, pouco septadas, eram compatíveis morfológicamente com *P. insidiosum*. Na imunistoquímica a marcação positiva foi um achado determinante na confirmação do diagnóstico, pois, segundo REIS JÚNIOR & NOGUEIRA (2002) hifas de *P. insidiosum* tem epítomos específicos do reino Stramenopila, portanto, diferente de outras micoses profundas. Ainda, não houve evidência nos fragmentos de tecidos analisados, de lesões sugestivas de habronemose cutânea ou sarcóide. SALLIS et al. (2003) relataram que amostras recebidas em rotina laboratorial, tinham diagnósticos presuntivos de habronemose cutânea ou sarcóide, porém, exames complementares adequados confirmaram diagnóstico de pitiose.

Adicionalmente, os animais foram positivos no teste de ELISA indireto. Pesquisas indicaram que ELISA é muito eficaz no diagnóstico de pitiose, possui sensibilidade maior e especificidade semelhante à imunodifusão (SANTURIO et al., 2004). Atualmente, é considerada a mais eficiente técnica imunológica para identificar casos precoces, apresenta sensibilidade, especificidade e eficiência de 97,72%, 90,27% e 93,1%, respectivamente (SANTURIO et al., 2006b). Esta prova propicia a consolidação do diagnóstico numa fase ainda precoce, é segura e praticamente não provoca estresse nos animais abordados. Utilizou-se somente este exame complementar como apoio diagnóstico ao caso de uma égua em avançado estágio de gestação. Com exceção de um equino que morreu uma semana após a abordagem, os demais foram submetidos à imunoterapia (n=10), sendo observado em 70% dos casos resposta satisfatória (Figura 19).



Figura19. Lesão circunscrita em equino decorrente de pitiose com 45 dias de evolução em A. Em B, mesmo animal 14 dias após primeira aplicação subcutânea do imunoterápico Pitium-Vac®. Os bordos tornam-se mais rasados com ferida mais ressequida. Em C, 14 dias após a segunda aplicação de Pitium-Vac®. Em D, mesmo equino com remissão completa após três aplicações.

Os animais que não responderam satisfatoriamente a imunoterapia foram submetidos, também, à excisão cirúrgica dos tecidos de granulação (Figura 20).



Figura 20. Lesão elíptica em equino decorrente de pitiose com aproximadamente três meses de evolução em A. Em B após 5ª aplicação subcutânea do imunoterápico Pitium-Vac® exibindo lesão mais ressequida, porém refratária quanto à involução, desenvolvendo extenso tecido de granulação. Em C após exérese cirúrgica, seguindo mais três doses do imunoterápico. Em D o mesmo animal após resolução. Foram utilizadas oito doses a cada 14 dias.

Assim, a cura utilizando-se da imunoterapia, associada ou não a excisão cirúrgica, totalizou 90% dos casos. Tratamentos conservadores, cirúrgicos e clínico-cirúrgicos têm sido preconizados para pitiose, sendo o sucesso terapêutico muito variado. Segundo HUBERT & GROOTERS (2002) o tratamento mais indicado consiste na exérese total do granuloma, combinado com imunoterapia específica. Outros fármacos tais como o iodeto de potássio, a anfotericina B e a imunoterapia têm sido empregados, também,

com resultados variáveis, porém, neste último a cura variou de 43 a 83% dos casos de pitiose (MENDOZA et al., 1996; RODRIGUES & LUVIZOTO, 2000; MONTEIRO, 1999 apud SALLIS et al., 2003; SANTURIO et al., 2004; BIAVA et al., 2007 e FREY JR. et al., 2007). Não houve nenhuma influência negativa da imunoterapia no animal gestante relativos à progênie ou parturição. Edemas e aumentos de volume de extensões variáveis, nos locais de aplicação do imunoterápico, foram reações adversas transitórias, e evoluíram satisfatoriamente para remissão completa sem sequelas.

É reconhecido o fato de que a eficácia terapêutica é fortemente aliada à temporalidade da evolução das lesões, se a doença possui um período prolongado, a imunoterapia não oferece bons resultados (LACAZ et al., 2002). Ressalta-se que os casos seguiram um padrão quanto ao tempo de recuperação e foram relativamente proporcionais às evoluções dos granulomas adicionado ao tempo da imunoterapia para o completo restabelecimento, ou seja, um animal com pitiose com 90 dias de evolução e tratamento por mais 60 dias, ocorreu cicatrização completa das feridas cutâneas em torno de cinco meses. Estes resultados chamam a atenção, pois lentidão na resposta ao tratamento pode ser interpretada como refratário e determinar desistência. Após o tratamento, os animais foram inspecionados por mais dois ciclos de cheia e um equino apresentou reinfecção. Inicialmente fora tratado de lesão no membro (canela) e após dois anos desenvolveu pitiose, com lesões ventrais amplas no abdômen, porém, novamente responsivas à imunoterapia (SANTOS et al. 2011). Ao que parece, mesmo animais que já apresentaram a enfermidade, não desenvolvem imunidade duradoura. Este fato é reforçado por estudos nos quais o imunoterápico não se mostrou eficaz de forma preventiva, sendo o efeito apenas curativo (SANTURIO et al., 2001; MENDOZA & NEWTON, 2005).

Três óbitos ocorreram durante os estudos, sendo um em cada rebanho e relacionado a feridas mais tardias ou múltiplas. Assim, morreu um equino senil não tratado, com lesão crônica após nove meses de evolução, um muar tratado que tinha dois sítios de lesão, mas se notou durante o tratamento involução da lesão no sítio podal e evolução da lesão peitoral associada à acentuada perda de peso. Um terceiro equino, também, com lesões múltiplas, foi refratário a imunoterapia isolada. Embora

tenha cicatrizado completamente as lesões associando as duas técnicas, perdeu peso gradativamente e teve infartamento inespecífico de linfonodo mamário, sendo encontrado morto. LEAL et al. (2001), FREY JR. et al. (2007) e MACIEL et al. (2008) afirmam que animais não tratados ou tratados tardiamente geralmente sucumbem, possivelmente devido a liberação de citocinas como fator de necrose tumoral, determinando injúrias sistêmicas e metabólicas graves (KLEIN & HOREJSI, 1997). O estabelecimento preciso da causa das mortes ficou prejudicado, considerando que os três casos não foram investigados em virtude do avançado estado de autólise e ataque de predadores naturais, quando do encontro das carcaças.

## CONCLUSÕES

A utilização de imunoterápicos como alternativa de tratamento da pitiose, associado ou não a cirurgia indica ser promissor e aplicável a campo. Adequações de manejo e práticas observacionais, visando identificação precoce de lesões cutâneas dentre outras enfermidades, são essenciais para a manutenção da saúde do rebanho de equídeos do Pantanal Norte. Como a temporalidade de evolução da pitiose em equídeos, é imperiosa no sucesso do tratamento com imunoterapia, sugere-se que o diagnóstico e terapia precoce seja o ponto chave da recuperação dos animais.

---

Trabalho posteriormente adaptado as normas do periódico ARS Veterinária, que após submissão foi aceito e publicado conforme referência abaixo:

SANTOS, C. E. P.; SANTURIO, J. M.; COLODEL, E. M.; JULIANO, R. S.; DA SILVA, J. A.; MARQUES, L. C. Contribuição ao estudo da pitiose cutânea em equídeos do Pantanal Norte, Brasil. **ARS VETERINÁRIA**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 134-140, 2011\*.

\*De acordo com ABNT 6023

## CAPÍTULO 6: EFICÁCIA DA IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DE PITIOSE FACIAL EM EQUINO

### RESUMO

A pitiose em equinos é uma doença proliferativa e ulcerativa que afeta principalmente a pele e tecido subcutâneo. Quadros cutâneos por vezes são confundíveis com habronemose. A doença é mais frequente em áreas palustres e locais com formação de lagoas de drenagem lenta e vegetação aquática, em ambiente de temperatura elevada. Descreve-se e discute-se neste relato o desenvolvimento de lesão na face em equino na região de Cuiabá, Mato Grosso, decorrente de pitiose e os aspectos da imunoterapia como tratamento base. O animal apresentou uma extensa lesão ulcerativa e secretória na face direita, além da presença de alguns focos necróticos com *sinus* de onde era possível se extrair *kunkers* a pressão digital. Com clínica compatível com pitiose, posteriormente confirmado por exames complementares, envolvendo análises histológicas, além de técnicas sorológicas (ELISA) e PCR, o animal foi submetido a imunoterapia, obtendo-se resposta satisfatória com remissão dos sinais, num total de 5 aplicações subcutâneas em intervalos de 14 dias entre tratamentos. A eficácia desta alternativa de tratamento, principalmente em áreas de difícil acesso cirúrgico é exequível em condições de campo, pelo baixo custo e facilidade de aplicação.

**Palavras-chave:** pitiose, imunoterapia, método diagnóstico

### INTRODUÇÃO

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa do tecido subcutâneo, causada pelo *Pythium insidiosum*, micro-organismo que acomete várias espécies de animais, inclusive humanos, sendo mais frequentes em equinos (CHAFFIN et al., 1995; MILLER, 1981).

Na América do Sul ocorre particularmente em áreas palustres, nas quais equinos permanecem por longos tempos (CHAFFIN et al., 1995; LEAL et al., 2001).

As lesões cutâneas distribuem-se mais frequentemente na extremidade distal dos membros e porção ventral da parede abdominal, embora ocorram também na face, provavelmente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos (CHAFFIN et al., 1995; SANTURIO et al., 2006a). A apresentação da lesão e a característica histopatológica são passíveis de confundimento, principalmente com habronemose, pela semelhança e formação de tecido de granulação exuberante (REIS JR & NOGUEIRA, 2002; PRESTES & MOYA, 2008).

Atualmente, técnicas sorológicas e moleculares foram desenvolvidas, objetivando suporte ao diagnóstico precoce e correto (SANTURIO et al., 2006b), incrementando o sucesso terapêutico. Diversos protocolos de tratamento têm sido utilizados, com resultados variáveis, incluindo protocolos exclusivamente clínicos, cirúrgicos ou associação de ambos, que foi apontada por alguns autores como o procedimento mais indicado (MILLER & CAMPBELL, 1982; HUBERT & GROOTERS, 2002; SANTURIO et al., 2006a).

Mesmo assim, há limitações relacionadas a impossibilidade de excisar toda área afetada por causa do envolvimento de estruturas anatômicas profundas que precisam ser preservadas (MILLER, 1981; LEAL et al., 2001), além da necessidade de monitoramento pós operatório incluindo curativos e aplicações diárias de medicamentos. Nessas condições, a imunoterapia representa uma opção promissora para o tratamento da doença e justifica estudos mais aprofundados para confirmar o seu potencial (SANTURIO et al., 2004). Objetiva-se com este relato descrever a eficácia da imunoterapia no tratamento da pitiose facial em equino.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O material deste estudo foi obtido de uma abordagem clínica ocorrida no município de Cuiabá, Mato Grosso, em julho de 2009. Os dados gerais do animal foram

informados através de inquérito dirigido aos tratadores e Médicos Veterinários da iniciativa privada que acompanharam inicialmente o animal.

O animal foi assistido na propriedade de origem, pelo setor de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT). Foi realizada biópsia incisional, sendo os fragmentos divididos em duas porções: uma conservada em formol a 10% para análise histopatológica de rotina, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Gomori metenamina – nitrato de prata (GMS) (PROPHET et al., 2002), e outra a exame molecular de PCR, conservada sob refrigeração, seguida de congelamento. Adicionalmente, foram colhidas, por venopunção jugular, em tubos com vácuo com e sem anticoagulantes, alíquotas de sangue destinadas a avaliação hematológica e teste imunoenzimático (ELISA) para pitiose (SANTURIO et al., 2006b).

Devido a localização anatômica da lesão e a dificuldade em transportar o animal, optou-se por tratar o animal exclusivamente com imunoterapia. Para tanto, utilizou-se aplicação de um frasco de imunoterápico (Pitium Vac®) a cada 14 dias, por via subcutânea e acompanhamento da evolução do caso, totalizando cinco aplicações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma égua, com cinco anos de idade, sem raça definida, criada em propriedade localizada em área de Cerrado, apresentou, na face, ferida de difícil cicatrização, com aproximadamente 60 dias de evolução. A lesão apresentou crescimento rápido e progressivo, pruriginosa, refratária a tratamentos com pomadas cicatrizantes, organofosforados, repelentes e ivermectina.

Na ocasião da abordagem, observou-se lesão cutânea única, de formato circular, ulcerada, com diâmetro de 14 cm, na face direita e equidistante entre olhos e narinas. A superfície era úmida e hemorrágica. Pequenos focos necróticos com *sinus* em permeio a lesão eram visibilizados e ao serem explorados por palpação e pressão digital, expeliam pequenas estruturas firmes, brancoamareladas, facilmente destacáveis, medindo em torno de um a três milímetros, compatível com *kunkers*. Os sinais vitais

encontravam-se dentro dos limites normais considerados para a espécie equina. Emaciação evidente.

A imunoterapia foi instituída já na primeira visita pressupondo tratar-se de um caso de pitiose. A partir da segunda aplicação, já confirmada a entidade nosológica por exames complementares, era notável a evolução satisfatória do quadro, ocorrendo o rasamento dos bordos da lesão com relação a pele íntegra e a diminuição das secreções. A cada intervalo de 14 dias, o diâmetro reduzia, com relação ao vistoriado na abordagem inicial, em torno de 15 a 20%. Na última aplicação aproximadamente 85% da área da lesão inicial havia regredido. A cronologia dos eventos e as características evolutivas foram sumarizadas na Tabela 10 e ilustradas na Figura 21. Depois de 45 dias do início do tratamento, houve expressivo ganho de peso do animal e aos 70 dias regressão completa, permanecendo apenas uma cicatriz.

Tabela 10. Demonstrativo da evolução da lesão relativo a cronologia e aspecto de úlcera decorrente de pitiose facial em uma égua, SRD, 5 anos de idade, submetida a cinco doses seriadas de imunoterapia (Pitium Vac®) pela via subcutânea em 2009, no município de Cuiabá - MT.

DATA	31/07	14/08	28/08	10/09	26/09	14/10
	Figura 2A	Figura 2B	Figura 2C	Figura 2D	Figura 2E	Figura 2F
APLICAÇÕES (SC)	1ª DOSE	2ª DOSE	3ª DOSE	4ª DOSE	5ª DOSE	--
DIÂMETRO LESÃO (CM)	14,00	11,71	8,70	5,41	3,84	2,0
REDUÇÃO (%)	INICIAL	15	38	61	72	86
SECREÇÃO*	PRES	PRES	DISCR	AUS	AUS	AUS
ULCERAÇÃO**	PRES	PRES	PRES	PRES	DISCR	AUS

PRES – PRESENTE

DISCR – DISCRETA

AUS - AUSENTE

\*RELATIVA A DESCARGA SEROSANGUINOLENTA

\*\*RELATIVA À SUPERFÍCIE DA LESÃO

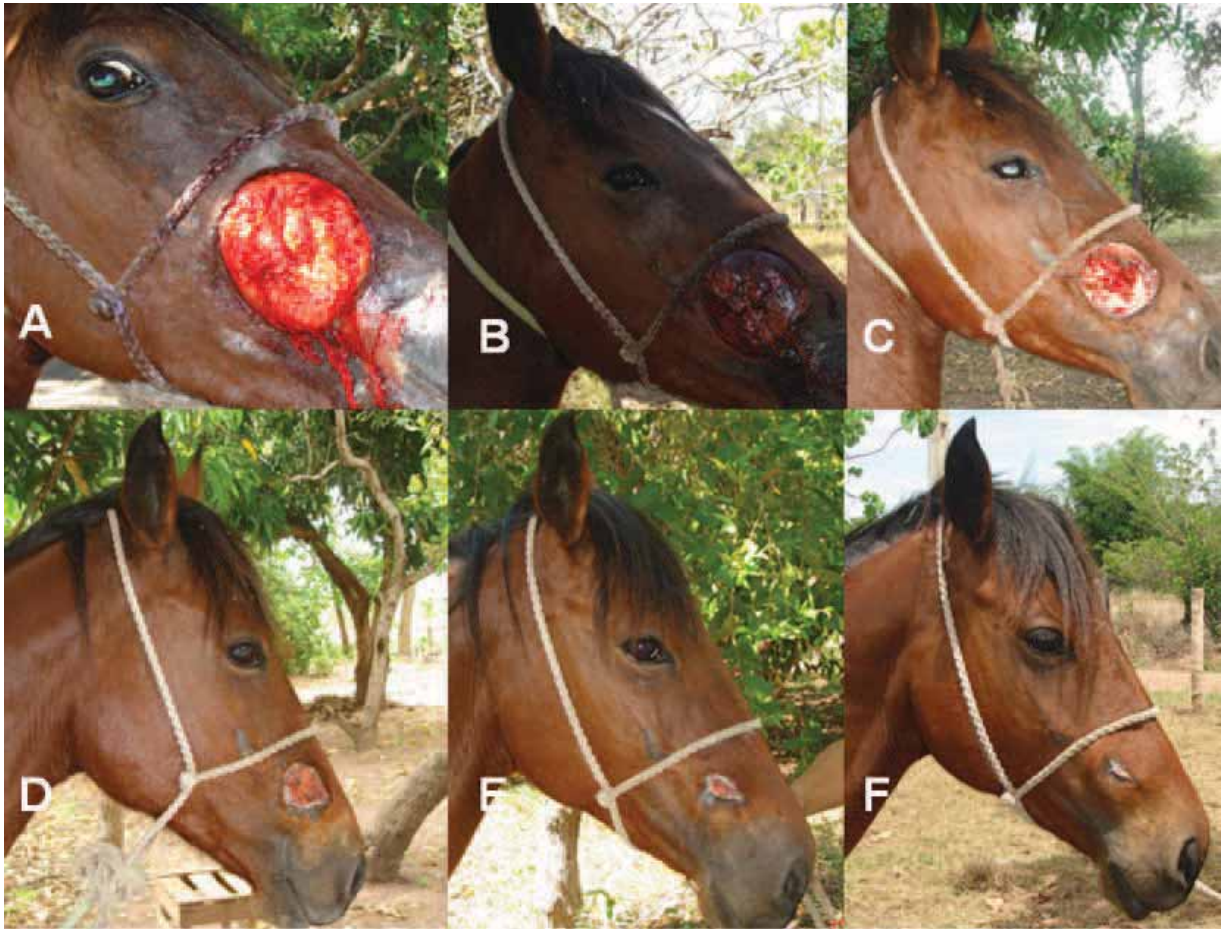


Figura 21. Equino exibindo extensa lesão facial ulcerada decorrente de pitiose no momento da abordagem inicial (A). Nas imagens subsequentes (B-E) as tomadas foram executadas a cada 14 dias, coincidindo com aplicação de imunoterápico (Pitium Vac®), totalizando cinco aplicações. Em F, resolução da lesão com discreta cicatriz.

No exame histopatológico foram visibilizadas áreas de necrose contendo imagens negativas tubuliformes de hifas ramificadas e irregulares semelhantes a oomicetos do gênero *Pythium*. Além disso, na coloração de Grocott houve impregnação de hifas pela prata. O PCR do tecido e análise sorológica, em concordância, apresentaram resultados positivos consolidando o diagnóstico. O hemograma demonstrou anemia e leucocitose com neutrofilia.

A suspeita de habronemose é muito difundida entre técnicos e tratadores, principalmente quando a localização da lesão ocorre na face e abdômen inferior. Dada

a similitude macroscópica e por vezes microscópica, é essencial subsidiar abordagens clínicas com exames complementares (PROPHET et al., 1992; CHAFFIN et al., 1995; LORENZI, 2003). Convém lembrar que em casos faciais, comumente a lesão que envolve habronemose parte da terceira pálpebra ou mesmo mantém íntimas relações com junções mucocutâneas, ou seja, normalmente tangenciam canto medial dos olhos. Outros pontos, também, podem ser atingidos como comissura labial e processo uretral. Além disso, a habronemose pode ocorrer em regiões do corpo a partir de ferimentos e escoriações que ocorrem com frequência em áreas que o animal apresenta limitações para espantar moscas vetoras, como regiões distais dos membros e porção ventral do abdômen (PRESTES & MOYA, 2008), essas são áreas cutâneas com grande casuística de pitiose, fato que certamente facilita erros de diagnóstico.

A rapidez da evolução da lesão facial, o prurido, as características secretórias, a refratariedade aos tratamentos relatados pelo proprietário e a perda progressiva de condição corporal, a despeito de manutenção do apetite e alimentação adequada, foram constituintes que permitiram nortear a suspeita diagnóstica para pitiose, sabendo que esses sinais clínicos, associados à anamnese, já haviam sido citados em outros relatos (KNOTTENBELT & PASCOE, 1998; SANTURIO et al., 2006a). Adicionalmente, as características da lesão no momento da abordagem foram consistentes para se suspeitar da relação causal, considerando outras descrições na literatura, com ênfase aos *sinus* nos focos necróticos, com presença de *kunkers* (CHAFFIN et al., 1995; KNOTTENBELT & PASCOE, 1998; HUBERT & GROOTERS, 2002; SANTURIO et al., 2004; FREY JR et al., 2007).

Epidemiologicamente, predominam relatos associando-se ocorrência de pitiose à características ambientais de umidade e temperatura elevadas, ou mesmo permanência dos animais em áreas alagadas. Apesar da última assertiva ter sido negada inicialmente pelo proprietário, dada a predominância de área típica de cerrado, verificou-se um microambiente favorável ao contágio da doença, uma vez que em inspeção detalhada notou-se uma pequena lagoa com abundância de vegetação aquática (Figura 22), onde equinos permaneciam parcialmente submersos, importante fator predisponente ao desenvolvimento da pitiose, que favorece a contaminação dos animais pelos zoósporos

móveis no ambiente, forma infectante de *Pythium insidiosum* (CHAFFIN et al., 1995; SANTURIO et al., 2004; SANTURIO et al., 2006a).



Figura 22. Equinos parcialmente submersos em baía com presença de plantas aquáticas, em região com elevadas temperaturas (acima de 30°C em média). Ambiente propício para presença de zoósporos de *Pythium insidiosum*.

Como a espécie equina apresenta muita facilidade a formações exuberantes de tecido de granulação, áreas incisionadas, objetivando biópsia podem não contemplar áreas focais de necrose, dificultando diagnóstico (REIS JR & NOGUEIRA, 2002), por este fato, associou-se outras técnicas, tais como testes moleculares (PCR) e sorológicos, com a finalidade de determinar precisamente a causa da lesão, diminuindo a possibilidade de erros (KNOTTENBELT & PASCOE, 1998; SANTURIO et al., 2006ab). Esses métodos auxiliares de diagnóstico ainda são pouco utilizados, mas sua aplicação deve ser estimulada tanto pela rapidez, quanto pela eficiência.

O diagnóstico e o tratamento precoces são fundamentais para o sucesso da imunoterapia. Por este fato, fora instituído o tratamento já na primeira abordagem a partir da suspeita, enquanto se processavam as amostras para o diagnóstico definitivo. Em casos tardios, é sabido que a eficácia da imunoterapia é inconsistente, tornando os casos pouco responsivos, com sequelas e disfunção, não raramente culminando com óbito do paciente (SANTURIO et al., 2004; FREY JR et al., 2007; MACIEL et al., 2008).

Em síntese, a sinalização para resposta satisfatória no sítio lesional seguiu a ordem de diminuição do aspecto secretório, rasamento de bordas, diminuição do prurido e aproximação das bordas em conjunto com a formação de fina camada de crosta na superfície. Além disso, houve redução do prurido e maior conforto no comportamento do animal. Concluiu-se neste caso que a imunoterapia foi uma alternativa terapêutica satisfatória, visto que a região acometida e a extensão da lesão dificultavam excisão cirúrgica.

Anemia e leucocitose com neutrofilia são achados frequentes em doenças debilitantes crônicas, comuns em processos inflamatórios de etiologia fúngica (LIMA et al., 2001; SACHER & MCPHERSON, 2002; LORENZI, 2003). A explicação dos efeitos curativos dos imunoterápicos está relacionado ao bloqueio de Th2 e atração de Th1, que por sua vez produz IFN $\gamma$  e IL2 que irão ativar mediadores de células mononucleares composta por linfócitos e macrófagos que danificam e destroem as hifas de *Pythium insidiosum* (SANTURIO et al., 2006a).

## **CONCLUSÃO**

A imunoterapia é uma técnica promissora para tratamento da pitiose em equinos, sendo necessários mais estudos para melhor avaliar alguns resultados adversos na resposta dos pacientes tratados.

---

Trabalho posteriormente adaptado as normas do periódico *Acta Scientiae Veterinariae*, que após submissão foi aceito e publicado conforme referência abaixo:

SANTOS, C. E. P.; JULIANO, R. S.; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Eficácia da imunoterapia no tratamento de pitiose facial em equino. ***Acta Scientiae Veterinariae***, Porto Alegre, (UFRGS impresso). v. 39, p.955-959, 2011\*.

\*De acordo com ABNT 6023

## **CAPÍTULO 7: A IMUNOTERAPIA PROTEGE EQUINOS CONTRA REINFECÇÃO DO OOMICETO *Pythium insidiosum*?**

### **RESUMO**

Reinfecção cutânea por *Pythium insidiosum* foi diagnosticada em um equino no Brasil. Lesões focais apareceram com dois anos de intervalo. A primeira infecção e a utilização da imunoterapia como tratamento base, não foram suficientes para estimular resposta imune eficiente para prevenir reinfecção. O uso de adjuvantes deve ser considerado na imunoterapia da pitiose.

**Palavras-chave:** imunoterapia; reinfecção; *Pythium insidiosum*

### **INTRODUÇÃO**

A pitiose, “swamp cancer”, provocada pelo oomiceto *P. insidiosum* causa geralmente lesões em equinos e outros mamíferos, incluindo humanos (CHAFFIN et al., 1995; SANTURIO et al., 2006a). A espécie equina é a mais atingida pela pitiose, não havendo a princípio nenhum fator predisponente (GAASTRA et al., 2010). Lesões cutâneas e subcutâneas afetando principalmente extremidades distais de membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal são usualmente observadas, provavelmente devido ao maior contato com águas contendo zoósporos produzidos pelo agente (MENDOZA et al., 1993; CHAFFIN et al., 1995).

O tratamento das infecções causadas pelo *P. insidiosum* nos animais e homem é variado e dificultado pelas características do agente, por não conter esteróides na membrana plasmática, componente-alvo da maioria das drogas antifúngicas (PEREIRA et al., 2008; GAASTRA et al., 2010). Excisão cirúrgica apresenta resultados satisfatórios de acordo com a evolução, embora possa ser complicado, especialmente quando membros são afetados. Atualmente, a imunoterapia tem sido aplicada, incrementando o sucesso terapêutico de procedimentos cirúrgicos ou se utilizado somente de forma

clínica curativa (MENDOZA & NEWTON, 2005; SANTURIO et al., 2006a). Ações como corte e cauterização, tratamento empírico comum no Pantanal, onde a pitiose é chamada “ferida da moda” por vezes são efetivos, embora alguns criadores informam episódios recorrentes em outros pontos (LEAL et al., 2001). Muitos animais frequentemente não se recuperam, o que geralmente leva a anemia e severa emaciação. Se não tratada com sucesso, a doença torna-se crônica e pode culminar com morte, embora casos atípicos com lesões quiescentes e sem influência sobre o escore corporal foram relatados e registrados somente na região do Pantanal (LEAL et al., 2001).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O material deste estudo foi obtido de uma abordagem clínica ocorrida no bioma Pantanal, Brasil, em maio de 2007 e dezembro de 2009. Os dados gerais do animal foram informados através de inquérito dirigido aos tratadores, sendo que o animal foi assistido na propriedade de origem.

Os procedimentos para validação dos casos foram executados nos dois eventos. Foram realizadas biópsias incisionais, sendo os fragmentos divididos em duas porções: uma conservada em formol a 10% para análise histopatológica de rotina, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Gomori metenamina – nitrato de prata (GMS) (PROPHET et al., 1992). A outra amostra foi refrigerada e utilizada para PCR (BOTTON et al., 2011). Ainda, amostras de sangue, para obtenção de soro, foram colhidas por punção da veia jugular, utilizando-se agulhas hipodérmicas 40x12 mm. A pesquisa de anticorpos específicos anti-*Pythium*, no soro dos equinos, foi realizada pela técnica ELISA indireto (SANTURIO et al., 2006b) junto ao LAPEMI da Universidade Federal de Santa Maria.

O protocolo terapêutico nos dois eventos foi efetuado, utilizando-se produto imunoterápico preparado por vortexação (Pitium-Vac®/ Laboratório de Pesquisas Micológicas- LAPEMI / UFSM- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/PANTANAL), a cada 14 dias de intervalo de acordo com as instruções da fabricação e informação de estudos anteriores.

## RESULTADOS

Um equino da raça Pantaneira, fêmea, com aproximadamente 2 anos de idade, apresentou uma lesão no membro pélvico esquerdo de rápido crescimento, em maio de 2007, com 45 dias de evolução. A inspeção observou-se lesão cutânea única, com superfície úmida, hemorrágica, ulcerada, de formato ligeiramente elíptico, bordas irregulares, com diâmetro aproximado de 15 cm, na região da canela. Focos necróticos com *sinus* em permeio a lesão eram visibilizados e expeliam pequenas estruturas firmes, brancoamareladas, facilmente destacáveis, medindo em torno de dois a cinco mm, compatível com *kunkers*. Os sinais vitais encontravam-se nos limites normais, com paciente apresentando moderada emaciação. Nos tecidos colhidos, foram visibilizadas hifas irregulares, ramificadas e raramente septadas com paredes espessas de coloração marron ao corante GMS (Figura 23 A). Estruturas semelhantes a hifas circundada por material eosinofílico, foram observadas em áreas necróticas correspondendo a reações de Splendori-Hoepli (H&E) (Figura 23 B). O animal foi positivo no teste de ELISA para pitiose.

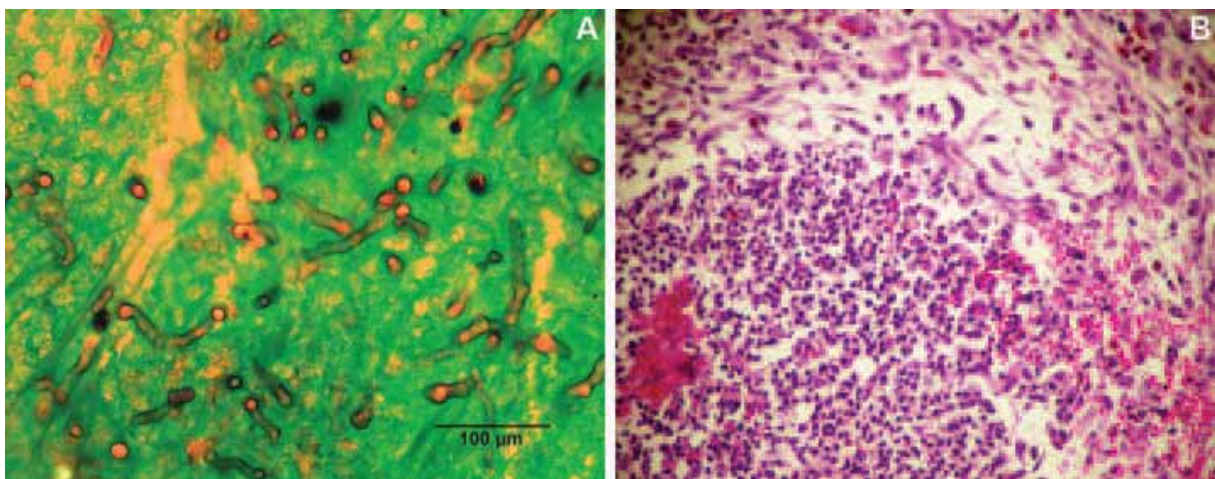


Figura 23. (A) Hifas de *Pythium insidiosum* tipicamente marcadas pela prata. (B) Área necrótica circundada por eosinófilos na reação de Splendori-Hoepli e imagens negativas de hifas (H&E Obj. 20X).

O animal foi submetido a cinco doses do produto imunoterápico. Remissão dos sinais e ganho de peso, foram observados após 4 meses, quando o animal foi considerado curado, isto é, demonstrou cicatrização completa da ferida e valores negativos de ELISA (Figura 24 A e 24 B).



Figura 24. Equino com pitiose na região da canela (A). Maio de 2007. (B) O animal foi considerado curado após cinco doses da imunoterapia.

Dois anos depois, em dezembro de 2009, uma nova lesão com curso clínico de 30 dias, foi observada no abdômen ventral do mesmo animal, desta vez com aproximadamente quatro anos de idade. A área ulcerada media ao redor de 20 cm de diâmetro, com edema perilesional de 60 cm. Descarga serosanguinolenta expelindo grande quantidade de *kunkers* com aproximadamente dois milímetros de tamanho foram observados. Os mesmos procedimentos relativos a exames complementares para validação do caso foram repetidos e novamente o animal foi submetido a imunoterapia, respondendo de modo satisfatório após quatro doses, no mesmo intervalo entre aplicações (Figura 25 A e 25 B). Cultura de *P. insidiosum* é sensível ao tempo e refrigeração, e provavelmente prejudicou o isolamento do agente neste estudo.



Figura 25. (A) O mesmo equino da figura 2, apresentando lesão abdominal, em dezembro de 2009. (B) O animal foi considerado curado após quatro doses da imunoterapia.

## DISCUSSÃO

Tanto o primeiro, quanto o segundo caso da infecção por pitiose, ocorreram em condições sazonais mais comumente relatada por outros autores, ainda que o primeiro ocorreu no final e o segundo no início do verão chuvoso (LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a). De acordo com LEAL et al. (2001) a falta de estudos sistemáticos impossibilitam concluir, se animais tratados por corte e cauterização, infectados em anos anteriores desenvolvem algum grau de imunidade. De fato, certamente existe uma predisposição individual que ainda não foi descoberta ou diferença de resistência entre indivíduos. Este dado é consistente, considerando reinfecção do paciente no caso estudado, após dois anos do desenvolvimento de doença clínica, além da submissão a imunoterapia como terapêutica. Mecanismos envolvidos na cura induzida pela imunoterapia contra *P. insidiosum* baseiam-se principalmente na resposta celular, considerando mudança da inflamação eosinofílica inicial para resposta mononuclear (SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). Os antígenos presentes no imunógeno são distintos daqueles da infecção natural e irão ativar mediadores de células composta por linfócitos citotóxicos e macrófagos que eventualmente podem eliminar a hifa de *P. insidiosum* de tecidos infectados (LEAL et al., 2001; SANTURIO et al., 2006a).

Nos dois eventos de desenvolvimento de doença clínica, esta estratégia terapêutica se mostrou muito eficaz. Ressalte-se que no primeiro episódio (relativo a lesão apendicular) a resposta foi mais lenta e no segundo (relativo a lesão abdominal) foi bem mais efetiva, que apesar da aparente gravidade do caso, respondeu mais rapidamente além de requerer menor número de doses. Duas hipóteses podem explicar tais diferenças observadas na resposta imune. A primeira, embora a lesão no segundo evento tenha sido aparentemente mais grave (dimensão e estado de emaciação), a mesma era mais recente. É reconhecida a eficácia do imunoterápico com relação ao curso clínico, sendo maior em lesões mais precoces (NEWTON & ROSS, 1993; MENDOZA & NEWTON, 2005; GAASTRA et al., 2010). A segunda, provavelmente exista alguma memória imunológica, insuficiente para prevenir nova infecção, porém com resposta potencializada no segundo tratamento. O ELISA demonstrou altos níveis de imunoglobulina G (IgG) após segunda infecção (130% acima do ponto de corte versus 72% da primeira infecção). Níveis de anticorpos anti-*Pythium* são altos em equinos infectados e geralmente aumentam durante imunoterapia, que sem dúvida ajudam no sucesso do tratamento da doença (SANTURIO et al., 2006a,b).

Curiosamente, o desenvolvimento de reinfeção, indica que mesmo em animais imunocompetentes os padrões antigênicos das hifas e de produtos da imunoterapia não são suficientes para prevenir novas infecções. Considerando que o micro-organismo não apresenta mutação como os vírus, o mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro equino é muito eficiente. As hifas de *P. insidiosum* multiplicam-se no interior dos *kunkers* onde produzem exoantígenos em grande quantidade, um evento que ao final, bloqueia a resposta imune (MILLER, 1981; MENDOZA & NEWTON, 2005). Além disso, características preventivas da imunoterapia não foram evidenciadas em estudos de campo nos animais tratados e não tratados, expostos as mesmas condições ambientais, nas quais reinfeção ocorre frequentemente em animais tratados (SANTURIO et al., 2004). De acordo com a hipótese de GAASTRA et al. (2010), tal constatação pode ser explicada pelo fato de que títulos de anticorpos IgG diminuem progressivamente após finalizar imunoterapia, e poderia proteger o hospedeiro por um curto período de tempo (um ano). Não obstante, o uso de diferentes adjuvantes pode

aumentar e fortalecer a resposta imune em coelhos infectados experimentalmente por *P. insidiosum* (LEAL et al., 2002).

## CONCLUSÃO

A imunoterapia não protege equinos frente a outros desafios, podendo ocorrer reinfecção. Como a inoculação experimental de *P. insidiosum* em outras espécies, com exceção do coelho, tem sido constantemente mal sucedida e estudos observacionais estão sujeitos a um número limitado de pesquisadores, o presente relato abre caminhos para o desenvolvimento de produtos imunobiológicos que induzam maior período de imunidade.

---

Trabalho posteriormente adaptado as normas do periódico *Clinical Vaccine and Immunology*, que após submissão foi aceito e publicado conforme referência abaixo:

SANTOS, C. E. P.; MARQUES, L. C.; ZANETTE, R. A.; JESUS, F. P. K.; SANTURIO, J. M. Does immunotherapy protect equines from the reinfection by oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v.18, n.8, p. 1397-1399, 2011\*.

\*De acordo com ABNT 6023

## CAPÍTULO 8 – IMPLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

As informações geradas com este trabalho descritivo observacional, com foco na dinâmica da doença em campos alagados, abriram portas para uma série de hipóteses e permitem inferir, que surgem novas perspectivas ao estudo da pitiose, relativo à mitigação de risco. Importante frisar, com base nos pressupostos elencados, que uma vez comprovados, poderá ser de grande aplicação no trânsito disciplinar em saúde e ambiente, englobando animais de produção e humanos, nos quais a enfermidade cursa com gravidade, determinando graves sequelas e risco de morte, mesmo em pacientes imunocompetentes.

As atividades de pesquisa a campo permitiram transferência de tecnologia, processos de educação continuada entre profissionais que atuam na área, favorecendo aplicação socioeconômica e biológica dos resultados obtidos. A primeira e importante transferência de tecnologia foi promover o reconhecimento da própria doença e outras similares que podem induzir a erros de diagnóstico, pois a dermatologia enquanto segmento de especialidade na área veterinária, envolve perdas econômicas e injúrias estéticas ao paciente acometido, requerendo, na grande maioria dos casos, exames complementares de apoio diagnóstico. Ainda, é também ponto de destaque disseminar conhecimentos quanto a alternativas terapêuticas atualizadas, exequíveis no campo, principalmente em locais de difícil acesso. Percebeu-se no decorrer do estudo um aporte de conhecimento de forma genérica aos estagiários, Médicos Veterinários, técnicos e produtores, além de assimilação e aplicabilidade dos resultados, quando do desenvolvimento conjunto de estudos de campo e notável interesse dos produtores com vistas ao controle da pitiose.

Do estudo observacional da emergência da doença nas áreas de risco associadas às particularidades ecoambientais e bioclimáticas, surgiu importante hipótese da participação de vetores na cadeia epidemiológica de *P. insidiosum*. Por certo, muitos fatores desconhecidos influenciam a dinâmica da doença, que interagem entre si, influenciando o ambiente como um todo, de modo a alterar microambientes ou resposta imune, que favoreçam permanência, proliferação, mecanismo de evasão e

disseminação do patógeno, fato sustentado pelas diversas tentativas frustradas de reprodução experimental, com inoculação de culturas puras do agente. Assim, prováveis mudanças determinadas pelos constituintes imunomoduladores presentes na saliva dos insetos, associadas às características ambientais, individuais e comportamentais de hospedeiros, podem determinar a expressão da doença clínica. Isto abre perspectivas em futuro próximo para tentativas de reprodução experimental-vetor associado, que por sua vez, desencadeará por continuidade, abertura de diversos campos para pesquisa de caráter multidisciplinar e envolvimento interinstitucionais. Pode-se exemplificar a interação entre hospedeiros, patógenos e vetores, a ocorrência de Lechiguana (paniculite cutânea focal fibrogranulomatosa em bovinos), que emerge associando a presença da bactéria *Manheimia granulomatis* ao parasitismo por *Dermatobia hominis* (LADEIRA, 2007). A simples inoculação experimental da bactéria não produz doença, a despeito do êxito da reprodução experimental inoculando-se o micro-organismo em lesões espontâneas de dermatobiose. Desta forma, sugere-se que há fatores desconhecidos na relação hospedeiro-parasita e ciclo do patógeno, que determinam a ocorrência da mesma, podendo ocorrer interação similar entre *Pythium insidiosum* e *Tabanidae*.

Certamente inúmeras dificuldades advirão de futuros delineamentos experimentais, dada a ausência de trabalhos relacionados à pitiose com esse perfil, uma vez que ainda não se conseguiu reproduzir a enfermidade na espécie mais atingida, tão pouco em outra, com exceção do coelho, que atualmente é o único animal utilizado como modelo experimental (SANTURIO et al., 2006a; GAASTRA et al., 2010). Esse objetivo, se atingido, pode de forma singular, servir a experimentação por tentativa e erro, envolvendo a pesquisas de drogas mais eficazes do ponto de vista curativo ou mesmo busca do aperfeiçoamento de imunógenos, visando caráter preventivo da doença. Certamente, os avanços obtidos poderão ser extrapolados e até aplicáveis para a espécie humana, objetivando mitigação de risco dessa micose emergente e grave, em regiões de risco.

Baseado nos resultados do estudo da imunoterapia, os dados permitem inferir ainda, que seja possível aperfeiçoar o imunógeno, estendendo o período de proteção,

seja pelo uso em vias alternativas de inoculação, ou pela associação com adjuvantes, capacitando os animais de forma preventiva, frente a repetidos desafios quando de novos ciclos das águas. Em estudo clínico comparando diferentes vias de inoculação (intradérmica e percutânea) com efetividade de vacina contra BCG, verificou-se que a via percutânea é menos reatogênica que a intradérmica, porém, estimula de forma menos seletiva a produção de interferon-gama pelos linfócitos Th1, considerada como melhor marcador da resposta imune protetora contra tubérculos (BRICKS, 2004). Este tipo de resposta é considerado crucial para a eficácia da imunoterapia, que por sua vez muda o padrão de resposta celular por injeção de exoantígenos, tal como ocorre em outras afecções como paracoccidiodomicose (PINTO et al., 2000 apud SANTURIO & FERREIRO, 2008). Reinfecções conforme se validou, podem ocorrer em animais tratados ou não por imunoterapia. O período entre os eventos tende a se estender em animais tratados, se comparado a não tratados, provendo amplo campo de pesquisa neste contexto. É importante frisar, que atualmente na espécie equina, todos os delineamentos experimentais, são inteiramente dependentes de casos naturais.

Finalizando, estudo futuro igualmente importante, relaciona-se a pesquisa de fatores predisponentes ao desenvolvimento da pitiose, uma vez que os mesmos não foram identificados e baseiam-se atualmente em hipóteses. Na Tailândia, até o momento não existe uma predisposição definida, porém, epidemiologicamente as notificações estão concentradas naquela região e em indivíduos predominantemente talassêmicos. No Brasil, existe somente um caso relatado, de manifestação cutânea (BOSCO et al., 2005), o que chama atenção para a probabilidade de outras possíveis ocorrências, passíveis de subnotificação, uma vez que a enfermidade tende a afetar indivíduos de baixa renda, em áreas alagáveis distantes de grandes centros, além de dificuldades inerentes ao diagnóstico preciso, característico da doença.

Análise dos perfis de diferentes hospedeiros com caracterização aprofundada da resposta imune em indivíduos susceptíveis e com diferentes graus de resistência, conforme vistos em bovinos na região do Pantanal podem prover contribuição para o entendimento da patogênese, as relações hospedeiro-patógeno e controle da pitiose.

**REFERÊNCIAS\***

ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, London, v. 406, p.782-787, 2000.

AHID, S. M. M. **Apostila didática em entomologia veterinária**. Mossoró: UFERSA, 2009. 80p.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, New York, v.2, p.675-680, 2001.

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

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

ANTONIASSI, N. A. B.; CÔRREA, A. M. R.; BECKER, C; SANCHES, E. M. C.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Feohifomicose cutânea causada por *Curvularia* sp. Em um equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n.1, p. 73-76, 2010.

ARGENTA, J. S.; ALVES, S. H.; SILVEIRA, F.; MABONI, G.; PEREIRA, D. I. B.; SPANAMBERG, A.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. *In vitro* paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of caspofungin. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v.145, p. 321-323 , 2010.

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

---

\* Conforme ABNT 6023

BARROS, A. T. M.; FOIL, L.D.; VAZQUEZ, S.A.S. **Mutucas (Diptera: Tabanidae) do Pantanal**: Sazonalidade e abundância relativa na subregião da Nhecolândia. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 18 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 48). Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/BPD48.pdf>>. Acesso em 12.ago. 2011.

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

BELO REIS, A. S.; DUARTE, M. D.; SOUSA, M. G. S.; FREITAS, N. F. Q. R.; YAMASAKI, E. M.; SILVA, A. G. M.; OLIVEIRA, C. M. C.; BARBOSA, J. D. Lesões traumáticas de pele causadas pelos espinhos de *Mimosa pudica* e *Mimosa debilis* em eqüídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n.9, p. 768-772, 2011.

BERRYESSA, N. A.; MARKS, S. L.; PESAVENTO, P. A.; KRASNANSKY, T.; YOSHIMOTO, S. K.; JOHNSTON, E. G.; GROOTERS, A. M. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 22, p. 1065–1069, 2008.

BEZERRA JÚNIOR, P. S.; PEDROSO, P. M. O.; PAVARINI, S. P.; DALTO, A. G. C.; SANTURIO, J. M.; DRIEMEIER, D. Equine intestinal pythiosis in Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n.2, p. 481-483, 2010.

BIAVA, J. S.; OLHOFF, D. R.; GONÇALVES, R. C.; BIONDO, A. W. Zigomicose em equino: revisão. **Revista Acadêmica**, Rio de Janeiro, v.5, p. 225-230, 2007.

BISSONNETTE, K. W.; SHARP, N. J.; DYKSTRA, M. H.; ROBERTSON, I. R.; DAVIS, B.; PADHYE, A. A.; KAUFMAN, L. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v.29, n.1, p. 39-44, 1991.

BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; ARAÚJO JÚNIOR, 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**, Atlanta, v. 11, p. 715-718, 2005.

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

BRELLOU, G. D.; KLEINSCHMIDT, S.; MENESES, F.; NOLTE, I.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Eosinophilic granulomatous gastroenterocolitis and hepatitis in a 1-year-old male Siberian Husky. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 43, n. 6, p.1022-1025, 2006.

BRICKS, L. F. Vacina BCG: via percutânea ou intradérmica? **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.8, n.2, p. 93-98, 2004.

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

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

BROWN, C. C.; MCCLURE, J. J.; TRICHE, P.; CROWDER, B. A. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.49, p.1866-1888, 1988.

BRUM, J. S.; SOUZA, T. M.; BARROS, C. S. L. Aspectos epidemiológicos e distribuição anatômica das diferentes formas clínicas do sarcoide equino no Rio Grande do Sul: 40 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n.10, p. 839-843, 2010.

BUBBERMAN, C. Twee uitgebreide gevallen van Hyphomycosis destruens equi. **Veeartsenijkundige Mededeeling**, v.12, p. 2-17, 1914.

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

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

CARVALHO, N. O. Hidrologia da Bacia do Alto Paraguai. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIOECONÔMICOS DO PANTANAL, 1º., 1984, Corumbá. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. p.43-49.

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

CESCON, G. T., CARNESELLA, S.; PEGORINI, L. N. C.; NÓBREGA, F. S.; BECK, C. A. C.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, L. O.; FERREIRA, M. P. Tratamento cirúrgico de

pitiose cutânea em um equino: relato de caso. In: CONBRAVET, 35<sup>o</sup>, 2008, Gramado. **Anais...** p. 702.

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. **Journal of the American Veterinary Association**, Schaumberg, v.2, p. 310-312, 1992.

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W. C. Cutaneous pythiosis in the horse. **The Veterinary Clinics or North America: Equine Practice**. v.11, n.1, p.91-103, 1995.

COLODEL, E. M.; ANGREVES, G. M.; ALBERTON, E. L.; WUTKER, R. M. M.; SANTOS, C. E. P.; NAKASATO, L. Inversão térmica como causa de mortalidade em bovinos no Estado de Mato Grosso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 33<sup>o</sup>, 2006, Cuiabá. **Anais...** CD-ROM.

CORRÊA B. F., PIZONI C., MENDES J. F., NONNEMACHER D. V. F., DE OLIVEIRA M. P. & PEREIRA D. I. B. Importância dos *kunkers* na manutenção do ciclo biológico do oomiceto *Pythium insidiosum* – resultados preliminares. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18<sup>o</sup>, 2009, Pelotas. **Anais...** Disponível em: <[http://www.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CB/CB\\_00303](http://www.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CB/CB_00303)>. Acesso em: 25.nov.2011.

DAVIS, D. J.; LANTER, K.; MAKSELAN, S.; BONATI, C.; ASBROCK, P.; RAVISHANKAR, J. P.; MONEY, N. P. Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. **Mycological Research**, Cambridge, v.110, p. 96-103, 2006.

DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; BURTON, A. H. Epi Info 6 Version 1.2. **A Word processing, date base, and statistic program for epidemiology on microcomputaters**. Atlanta: Center for Disease Control, 2001.

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

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

DE HAAN, J. Bosartige Schimmelkrankheit des Pferdes (Hyphomycosis destruens equi). **Zentralbl. Bakt. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.** v.31, p. 758-763, 1902.

DIAL, S. M. Fungal diagnostics: Current techniques and future trends. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 37, p. 373-392, 2007.

DICK, M. W. **Straminipilous Fungi**: systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine Straminipilous Protist, the Plasmodiophorids and similar organisms. London: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 67.

DROUIN, V. Sur une nouvelle mycose du cheval. **Veterinary Medical Records**, v. 3, p. 337–344, 1896.

EVANS A. G. Alterações na pele. In: SMITH B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993. n.1, p. 207.

FANTIN-CRUZ, I.; GIRARDI, P.; ZEILHOFER, P.; COLLISCHONN, W.; NUNES DA CUNHA, C. Unidades fitofisionômicas em meso-escala no Pantanal Norte e suas relações com a geomorfologia. **Biota Neotrópica**, Campinas, v. 10, n.2, p. 31-38, 2010.

FERREIRA, C.; PALHARES, M. S.; MELO, U. P.; SILVA FILHO, J. M. Fatores que afetam a cicatrização em equinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, São Paulo, v. 29, p. 30-40. 2010.

FISH, P.A. **Leeches: a histological investigation of two cases of equine mycosis with a historical account of a supposed similar disease, called bursatte, occurring in India.** In: ANNUAL REPORT OF THE BUREAU OF ANIMAL INDUSTRY. 12<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 1895-96, p. 229–259.

FISCHER, J. R.; PACE, L. W.; TURK, J. R.; KREEGER, J. M.; MILLER, M. A.; GOSSER, H. S. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.6, n.3, p. 380-382, 1994.

FOIL, C. S. **Update on pythiosis (oomycosis).** In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, Orlando, 1996. p. 57-63.

FRANÇA, J. M. **Sobre o comportamento de alguns tabanídeos do litoral e primeiro planalto do Estado do Paraná, Brasil (Diptera–Tabanidae).** 1975. 63f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil. 1975.

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

GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A.; DE COCK, A. W. A. M.; EXEL, T. K.; PEGGE, R. B. G.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.146, n.1-2, p. 1-16, 2010.

GABRIEL, A. L.; KOMMERS, G. D.; TROST, M. E.; BARROS, C. S. L.; PEREIRA, D. B.; SCHWENDLER, S. E.; SANTURIO, J. M. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 583-587, 2008.

GARCIA, E. A. C. **O clima no Pantanal Matogrossense**. Corumbá: EMBRAPA-UEPAE, 1984, 39 p. (Circular Técnica, 14).

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

GIMENO, E. J.; MASSONE, A. R.; PORTIANSKY, E. L. **Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en patología veterinaria**. In: Decimo Curso Internacional de Posgrado en técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinhistoquímica y Microscopia Eletronica, 10º, La Plata: 1999. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 1999. p. 61-111.

GOAD, M. E. Pulmonary pythiosis in a horse. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 21, p. 26-262, 1984.

GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidosis and zygomycosis in small animals. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 695-720, 2003.

GROOTERS, A. M. Pythiosis and Zygomycosis. In: SELTON, D.; LONG, M. (Ed.). **Equine infectious diseases**. Saunders Elsevier, Saint Louis: Missouri, 2007. p. 412-419.

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**. Lawrence, v. 16, n.2, p.147-152, 2002.

GROOTERS, A. M.; LEISE, B. S.; LOPEZ, M. K.; O'REILLY, K. L. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.16, p. 142–146, 2002a.

GROOTERS, A. M.; WHITTINGTON, A.; LOPEZ, M. K.; BOROUGHS, M. N.; ROY, A. F. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.14, p. 288–294, 2002b.

HARSENACK, H.; CORDEIRO, J. L. P.; HOLFMANN, G. S. UFRGS. **O clima da RPPN Sesc Pantanal**. Porto Alegre: Instituto de Biociências Centro de Ecologia, UFRGS, 2003. 26p.

HARVEY, J. W.; ASQUITH, R. L.; SUSSMAN W. A.; KIVIPELTO, J. Serum ferritin, serum iron, and erythrocyte values in foals. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.48, n.9, p.1348-1352, 1987.

HEADLEY, S.A.; ARRUDA JÚNIOR, H.N. Equine cutaneous pythiosis: a report of four cases. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.1, p. 289-292, 2004.

HELMAN, R. G.; OLIVER, J. Pythiosis of the digestive tract in dogs from Oklahoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.35, n.2, p.111-114, 1999.

HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E. **Epidemiology in medicine**. Boston: Brown Company, 1987. 383p.

HUBERT, J. D.; GROOTERS, A. M. Treatment of equine pythiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24. p. 812-815. 2002.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006: resultados preliminares**. IBGE: Rio de Janeiro, 2007.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia – **Gráfico das normais climatológicas**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/html/clima/gráficos>> acesso em: 12.jun.09.

JAEGER, G. H.; ROTSTEIN, D. S.; LAW, J. M. Prostatic pythiosis in a dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, n. 5, p. 598-602, 2002.

JINDAYOK, T.; PIROMSONTIKORN, S.; SRIMUANG, S.; KHUPULSUP, K.; KRAJAEJUN, T. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v.16, n.7, p.1047–1051, 2009.

KAUFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 143, n.1, p.3-7. 1998.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C., STALPERS, J. A. **Dictionary of fungi**. Wallingford: CABI Bioscience, 2001. p. 650.

KLEIN, J.; HOREJSI, V. Cytokines and their receptors. In: KLEIN, J.; HOREJSI, V. **Immunology**. 2 nd ed. London: Blackwell Science, 1997. p. 291-326.

KNOTTENBELT, C.; PASCOE, R. **Afeções e distúrbios do cavalo**. São Paulo: Manole. 1998. 284p.

KOKKINOPOULOS, I.; JORDAN, W.J.; RITTER, M.A. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. **Molecular Immunology**, Elmsford, v. 42, p.957-968, 2005.

KRAJAEJUM, T.; KHOSITNITHIKUL, R.; LERKSUTHIRAT, T.; LOWHNOO, T.; RUJIRAWAT, T.; PETCHTHONG, T.; YINGYONG, W.; SURİYAPHOL, P.; SMITTIPAT, N.; JUTHAYOTHIN, T.; PHUNTUMART, V.; SULLIVAN, T. D. Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Fungal Biology**. v. 115, n.7, p.683-696, 2011.

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

KRAJAEJUN, T.; SATHAPATAYAVONGS, B.; PRACHARKTAM, R.; NITIYANANT, P.; LEELACHAIKUL, P.; WANACHIWANAWIN, W.; CHAIPRASERT, A.; ASSANASEN, P.; SAIPETH, M.; MOOTSIKAPUN, P.; CHETCHOTISAKD, P.; LEKHAKULA, A.; MITARNUN, W.; KALNAUWAKUL, S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; CHIEWCHANVIT, S.; TANANUVAT, N.; SRISRI, S.; SUANKRATAY, C.; KULWICHIT, W.; WOMGSAISUWAN, M.; SOMKAEW, S. Clinical and epidemiological analysis of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 43, p. 569–576, 2006.

LACAZ, C.S. Pitiose. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. (Ed), **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p.770-744.

LADEIRA, S. R. L. Lechiguana. In: RIET-CORREA, F; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Org.). **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti. v.1, 2007. p. 325-330.

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

LEAL, A. T.; SANTURIO, J. M.; LEAL, A. B. M.; CATTO, J. B.; FLORES, E. F.; LUBECK, I.; ALVES, S. H. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum* antigens. **Journal de Mycologie Medicale**, Paris, v.15, p. 63-68, 2005.

LEAL, A. T.; SANTURIO, J. M.; LEAL, A. B. M.; PINTO, A. M.; GRIEBELER, J; FLORES, E. F.; FERREIRO, L.; CATTO, J. B. Serological response in rabbits immunized with *Pythium insidiosum* antigens associated with different adjuvants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.6, p.1027-1032, 2002.

LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F. Hipotermia. In: RIET-CORREA, F; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Org.). **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. n.2, p. 637-641.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. Química do sangue. In: LIMA, A.O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. (Ed). **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2001. p. 2.1-2.66.

LÖFF, H. K.; CAVALHEIRO, A. S.; CORTE, F. DE LA; KURTZ FILHO, M; FERNANDES, C. E. Pitiose Equina: relatos de casos em éguas crioulas no Sul do Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 178, p. 8-10, 2010.

LORENZI T.F. Anemias. In: LORENZI, T.F. (Ed). **Manual de hematologia, propedêutica e clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003, p.193-288.

LUNA, L G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Force Institute of Pathology**. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1968. 258p.

LUVIZARI, F. H.; LEHMKUHL, R. C.; SANTOS, I. W. Pitiose equina no estado do Paraná – primeiro relato de caso. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.2, p. 99-102, 2002.

MACDONALD, E.; MILLWARD, L.; RAVISHANKAR, J.P.; MONEY, N.P. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.37, p. 245–249, 2002.

MACIEL, I. C. F., SILVEIRA, J. T.; MAIA, C. A.; SOUSA, R. M.; OLIVEIRA, N. J. F.; DUARTE, R. D. Pitiose fatal em equinos tratado inicialmente para habronemose cutânea. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n. 3, p. 293-297, 2008.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. J. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**. Cambridge, v. 91, p.295-298, 1997.

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

MENDOZA, L. Pitiosis: una revisión. **Revista Ibérica de Micología**, Barcelona, v. 4, p. 159-175,1987.

MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*. In: MERZ, W.G.; HAY, R.J. (Ed.). **Medical Mycology**. Oxford: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th ed., 2005. p. 617-630.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal Medical and Veterinary Micology**, Oxfordshire, v. 6, n.4, p. 151-164, 1996.

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

MENDOZA, L.; ALFARO, A. A.; VILLALOBOS, J. Bone lesions caused by *Pythium insidiosum* in a horse. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 26, n.1, p. 5-12, 1988.

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

MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; MANDY, W.; GLASS, R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.4, n.6, p. 715-718, 1997.

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

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

MENDOZA, L.; MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* de Cock et al. 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987. **Mycoses**, Berlim, v. 32, p. 73–77, 1989.

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

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

MILLER, R. I. Granulomatous and neoplastic disease of equine skin. **Veterinary Reviews and Monographs**, 6. Townsville: James Cook University of North Queensland, 1983. Australia. p.1-92.

MILLER, R. I. Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.186, n.5, p. 473-478, 1985.

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

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

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v.21, n.4, p. 331-341. 1983.

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

MONTEIRO, A. B. **Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo**

***Pythium insidiosum***. 1999. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

MOORE, C. P. Moléstias do olho. In: SMITH B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993. n.1. p. 1243.

MORAES, A.S.; RESENDE, E.K. de; RODRIGUES, C.A.G.; MAURO, R. de A.; GALDINO, S.; OLIVEIRA, M.D. de; CRISPIM, S.M.A.; VIEIRA, L.M.; SORIANO, B.M.A.; ABREU, U.G.P. de; MOURÃO, G. de M. Embrapa Pantanal: 25 anos de pesquisas em prol da conservação do Pantanal. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIOECONÔMICOS DO PANTANAL, 3., 2000, Corumbá. Os desafios do novo milênio. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2001. 55p. 1 CD-ROM.

MORTON, L.D.; MORTON, D.G.; BAKER, G.J.; GELBERG, H.B. Chronic eosinophilic enteritis attributed to *Pythium* sp. in a horse. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 288, p. 542–544, 1991.

MOURA, D. J. DE; MAIA, A. P. DE A.; VERCELLINO, R DO A.; MEDEIROS, B. B. L.; SARUBBI, J.; GRISKA, P. R. Uso da termografia infra-vermelha na análise da termorregulação de cavalo em treinamento. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.31, n.1, p.23-32, 2011.

NASIR, L.; REID, S. W. J. Bovine papilloma viral gene expression in equine sarcoid tumors. **Virus Research**, Amsterdam, v. 61, p. 171-175. 1999.

NEVES, S. M. A. S.; CRUZ, C. B. M.; NEVES, R. J.; SILVA, A. Identificação e caracterização das unidades ambientais do Pantanal de Cáceres/MT, através de geotecnologias. In: SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL, 2º. 2009. Corumbá. **Anais...**Campinas: Embrapa Informática Agropecuária/INPE. 2009. p. 516-526.

NEWTON, J. C.; ROSS, P. S. Equine pythiosis: an overview of immunotherapy. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v.15, n.3, p. 491-493, 1993.

NÓBREGA NETO, P. I.; LUNA, S. P. L.; CARREGARO, A. B.; QUEIROZ, P.; MANNARINO, R.; MASSONE, F. Efeito da lidocaína na potencialização da anestesia com xilazina, quetamina e éter gliceril guaiacol em equinos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 9, n. 1, p. 334-336, 2002.

PATTON, C. S.; HAKE, R.; NEWTON, J.; TOAL, R. L. Esophagitis due to *Pythium insidiosum* infection in two dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.10, n. 3, p.139-142,1996.

PEDROSO, P. M. O.; BEZERRA JÚNIOR, P. S.; PESCADOR, C. A.; DALTO, A. G. C.; COSTA, G. R.; PEREIRA, D. I. B.; SANTURIO, J. M. & DRIEMEIER, D. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n.1, p. 49-52, 2009.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 596p.

PEREIRA, D. I. B.; MEIRELES, M. C. A. Pitiose. In: RIET-CORREA, F; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Org.). **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, n.1, 2007. p. 457-466.

PEREIRA, D. I. B.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; ARGENTA, J. S.; CAVALHEIRO, A. S., FERREIRO, L. Zooprogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 143-147, 2008.

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

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

PÉREZ, R. C.; LUIS-LEÓN, J. J.; VIVAS, J. L.; MENDOZA, L. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. . **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.109, p. 121-128, 2005.

PESAVENTO, P. A.; BARR, B.; RIGGS, S. M.; EIGENHEER, A. L.; PAMMA, R.; WALKER, R. L. Cutaneous pythiosis in a nestling white faced ibis. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 45, p. 538–541, 2008.

PETRIE, A.; WATSON, P. **Estatística em ciência animal e veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2009. p. 236.

PHILIPS, A. J.; ANDERSON, V. L.; ROBERTSON, E. J.; SECOMBES, C. J., VAN WEST P. New insights into animal pathogenic oomycetes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n.1, p. 13-19, 2008.

PINTO, A. R.; PUCCIA, R.; DINIZ, S. N.; FRANCO, M. F.; TRAVASSOS, L. R. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, Kidlington, v.18, p.3050-3058, 2000.

POOLE, H.; BRASHIER, M. Equine Cutaneous Pythiosis. **Compendium**, Detroit, v.25, p. 229-236, 2003.

POOT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Corumbá: Embrapa Informação Tecnológica, 1994. p. 320.

PRESTES, N. C.; MOYA, C. F. Habronemose em cavalo: revisão. **Revista Brasileira de Medicina Equina**, São Paulo, v.20, p. 22-28, 2008.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. p. 279.

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**, Schaumburg, v. 205, p. 337-339, 1994.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONELLY W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: ARTMED, 2005. 79p.

RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 17, p. 262-269, 2005.

RAMOS, A. T.; SOUZA, A. B.; NORTE, D. M.; FERREIRA, J. L. M.; FERNANDES, C. G. Tumores em animais de produção: aspectos comparativos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.1, p.148-154, 2008.

RAVISHANKAR, J. P.; DAVIS, C. M.; DACIS, D. J.; MACDONALD, E.; MAKSELAN, S.D.; MILLWARD, L.; MONEY, N. P. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 34, p. 167–175, 2001.

REES, C. A. Disorders of the skin. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M.; SELLON, D. C. (Ed.). **Equine internal medicine**. 2nd ed. Saunders, 2004. p. 695-696.

REIS JR, J. L. **Pitiose equina**: o popular formigueiro da Baixada Campista. Campos dos Goitacazes: Editora UENF, 2000.

REIS JR, J. L.; CARVALHO, E. C. Q; NOGUEIRA, R. H. G.; LEMOS, L. S.; MENDOZA, L. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 289–295, 2003.

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

REZENDE, A.S.C. Raças raras da fazenda brasileira: equinos e asininos. **Ação Ambiental**, Viçosa, v.3, p.15-18, 2001.

RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; AZEVEDO, E. O.; SIMOES, S. D. V.; SILVA, S. M. S.; VILELA, R.; MENDOZA, L. Outbreak of rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraíba, Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 29-35, 2008.

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

ROONEY, J. R.; ROBERTSON, J. L. **Equine pathology**. Iowa: State University Press, 1996. p.287-307.

RODRIGUES, A.; GRAÇA, D. L.; FONTOURA, C.; CAVALHEIRO, A. S.; HENSLEY, A.; SCHWENDLER, S. E.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Intestinal dog pythiosis in Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 16, n.1, p. 37-41, 2006.

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

SACHER, R. A.; MCPHERSON, R. A. Hematologia. In: SACHER, R.A.; MCPHERSON, R. A. (Ed.). **Interpretação clínica dos exames laboratoriais**. 11. ed. São Paulo: Manole, 2002. p. 431-441.

SALGADO, B. S.; FERREIRA, T. S.; VILORIA, M. I. V., CONCEIÇÃO, L. G. Avaliação clínica e epidemiológica dos casos de sarcoide equídeo atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Viçosa. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 15, p.6-8, 2008. Suplemento.

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

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

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

SANTOS, C. E. P. DOS; MARQUES, L. C.; ZANETTE, R. A.; JESUS, F. P. K.; SANTURIO, J. M. Does immunotherapy protect equines from the reinfection by the

oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 18, p. 1397-1399, 2011.

SANTOS, C. E. P. DOS; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Perfil hemoglobínico de equinos susceptíveis e resistentes à pitiose cutânea no Pantanal Norte. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNESP, 6º, 2010, Jaboticabal. **Anais...**São Paulo: Associação de Pós-graduandos, 2010. CD-ROM.

SANTOS, S. A.; MAZZA, M. C. M.; SERENO, J. R. B.; MAZZA, C. A. S.; PEDREIRA, A. C. M. S.; MARIANTE, A. A. S.; SILVA, J. A.; MARQUES, M. C. DE A. Sistema de criação de cavalos pantaneiros no pantanal. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 53, p. 333-336, 2004.

SANTOS, S. A.; MAZZA, M. C. M.; SERENO, J. R. B.; ABREU, U. G. P.; SILVA, J. A. **Avaliação e conservação do cavalo Pantaneiro**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1995. (Circular Técnica, 21).

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

SANTURIO, J. M.; ARGENTA, J. A.; SCHWENDLER, S. E.; CAVALHEIRO, A. S.; PEREIRA, D. I. B.; ZANETTE, R. A.; ALVES, S. H.; DUTRA, V.; SILVA, M. C.; ARRUDA, L. P.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**, London, v. 163, p. 276–277, 2008.

SANTURIO, J. M.; CATTO, J. B.; COMASTRI FILHO, J. A.; LEAL, A. T.; LEAL, A. B. M. **Ferida da moda: epidemiologia, diagnóstico, tratamento e experiência com equinos infectados no pantanal**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2004. (Comunicado Técnico, 34).

SANTURIO, J. M.; CATTO, J. B.; LEAL, A. B. M.; LEAL, A. T. **Tratamento imunoterápico da pitiose equina**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2001. (Comunicado Técnico, 67).

SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. **Pitiose**: uma abordagem micológica e terapêutica. Editora UFRGS, 2008. p. 111.

SANTURIO, J. M.; LEAL, A. T.; LEAL, A. B. M.; ALVES, S. H.; LÜBECK, I.; GRIEBELER, J.; COPETTI, M. V. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n.1, p.47-50, 2006b.

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

SANTURIO, J. M.; LEAL, A. T.; MONTEIRO, A. B. Pythiose. In: LEFÉVRE, P.C.; BLANCOU, J.; CHERMETTE, R. (Ed.). **Principales maladies infectieuses et parasitaires du Bétail – Europe et Régions Chaudes**. Paris: Editions TEC & DOC et Editions Médicales Internationales, 2003b. v.2, p. 1231-1241.

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

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

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

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. JR. Neoplastic and non-neoplastic tumors. In: SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. JR. **Equine dermatology**. St Louis: W. B. Saunders, 2003. p. 719-731.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica (para ciência do comportamento)**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 320p.

SILVA, F. S. A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luis, v.3, n.3, p. 3-17, 2009.

SILVA J. dos S. V. da, ABDON M. de M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 1703-1711, 1998.

SILVA, M. F.; GOMES, T; DIAS, A. S.; MARQUES, J. A.; JORGE, L. M.; FAÍSCA, J. C.; PIRES, G. A.; CALDEIRA, R. M. Estimativa da idade dos equinos através do exame dentário. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.98, n. 547, p. 103-110, 2003.

SILVEIRA, J. S.; CÔRREA, B. F.; HOFSTÄTER, B. D. M.; BOTTON, S. A.; DE AZEVEDO, M. I.; PEREIRA, D. I. B. Isolamento de *Pythium insidiosum* em áreas endêmicas de pitiose equina no estado do Rio Grande do Sul : resultados parciais. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19<sup>º</sup>, 2010, Caxias do Sul. **Anais eletrônicos...** Disponível em: < <http://www.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/cb.htm>>. Acesso em: 25. nov. 2011.

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

SOARES, K. D. A.; ESCODRO, P. B.; OLIVEIRA, C. F.; FEITOSA, B. C. O. Melanoma em equinos: revisão para atuação veterinária em cavalos carroceiros de Alagoas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, São Paulo, v. 23, p. 12-17, 2009.

SOARES, A. F.; SILVA, J. dos S. V. da; FERRARI, D. L. Solos da paisagem do Pantanal brasileiro – adequação para o atual sistema de classificação. In: SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS DO PANTANAL, 1., 2006, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Informática. Agropecuária/INPE, 2006. p.275-284.

SOUZA, F. A. L.; Souza A. B.; Souza Jr. A.; Costa F. A. L.; Mendoza, L.; Carvalho, E. M. S.; Silva, S. M. M. S. Pitiose em ovinos no estado do Piauí. Disponível em: <[www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/.../R0255-1.pdf](http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/.../R0255-1.pdf)> Acesso em: 15.ago.2010.

SYMMERS, W.C. Histopathology of phycomycosis. **Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale**, Antwerpen, v.52, p. 365-390, 1972.

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

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

TIZARD, I. R. Imunidade inata: macrófagos In: Ibid. (Ed.). **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca, 2002. p. 28-38.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas que causam calcificação sistêmica (calcinose). In: Ibid. (Ed.). **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2000, p.189-199.

TROST, M. E.; GABRIEL, A. L.; MASUDA, E. K.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, R. F.; KOMMERS, G. D. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrointestinal canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n.8, p.673-679, 2009.

VICARIVENTO, N. B.; PUZZI, M. B.; ALVES, M. L.; ZAPPA, V. Pitiose: Uma micose emergente nos humanos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.6, p. 1-7. 2008.

VIDELA, R.; VAN AMSTEL, S. O'NEILL, S. H.; FRANK, L. A.; NEWMAN, S. J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. **Medical Mycology**. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). Oxford, v. 50, n.2, p. 219-224. 2011.

YAGER, J. A.; SCOTT, D. W. The skin and appendages,. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER R. N. **Pathology of domestic animals**. 4th. San Diego: Academic, 1993. p. 692-693.

WADE, J. S.; TUCKER, J. C.; HAMMAN, R. G. Comparative analysis of the Florida Everglades and the South American Pantanal. In: INTERAMERICAN DIALOGUE ON WATER MANAGEMENT, 1., 1993, Miami. **Proceedings**. Miami: SFWMD, 1994. p.31-70.

WALKER, C.A.; VANWEST, P. Zoospore development in the oomycetes. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 10–18, 2007.

WELLAHAN, J.F.; FARINA, L.L.; KEOUGHAN, C.G.; LAFORTUNE, M.; GROOTERS, A.M.; MENDOZA, L.; BROWN, M.; TERREL, S.P.; JACOBSON, E.R.; HEARD, D.J. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedaries*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 35, n.4, p. 564-568, 2004.

WHITE, S. D.; EVANS, A. G.; VAN METRE, D. C. Diseases of the skin. In: SMITH B.P. (Ed.). **Large animal internal medicine**. 3<sup>rd</sup> ed. Saint Louis: Mosby, 2002. p.1200-1232.

WHITE, S. D.; GHODDUSI, M.; GROOTERS, A. M.; JONES, K. Cutaneous pythiosis in a California nontravelled horse. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 19, n.6, p. 391–394, 2008.

WILLIAMS A. O. Pathology of phycomycosis due to *Entomhophthora* and Basidiobolus species. **Archives of Pathology**. v. 87, p. 13-20, 1969.

WITKAMP, J. Bijdrage tot de kennis van de Hyphomycosis destruens. **Ned. Ind. Blad voor Diergeneeskd. en Dierenteelt**, v. 36, p. 229–245. 1924.

WITKAMP, J. Het voorkomen van metastasen in de regionale lymphlieren by Hyphomycosis destruens. **Nerlandse Ind. Blad voor Diergeneeskd. en Dierenteelt**, v. 37, p. 79–102, 1925.

WWF-Brasil. **RPPNs na Bacia do Alto Paraguai - Brasil**: Catálogo. Brasília, 2004.

## APÊNDICE

## REGISTRO E BULA DO IMUNOTERÁPICO UTILIZADO

18.12 - CBRN - Curso de Documentação e Informação Científica

18.12 - Bula Mitográfica de Produto

(1) Nome do Produto: PITIUM-VAC

(2) Nome do Registro: 001/00000000

(3) Apresentação: 001, 002, 003, 004, 005, 006, 007, 008, 009, 010, 011, 012, 013, 014, 015, 016, 017, 018, 019, 020, 021, 022, 023, 024, 025, 026, 027, 028, 029, 030, 031, 032, 033, 034, 035, 036, 037, 038, 039, 040, 041, 042, 043, 044, 045, 046, 047, 048, 049, 050, 051, 052, 053, 054, 055, 056, 057, 058, 059, 060, 061, 062, 063, 064, 065, 066, 067, 068, 069, 070, 071, 072, 073, 074, 075, 076, 077, 078, 079, 080, 081, 082, 083, 084, 085, 086, 087, 088, 089, 090, 091, 092, 093, 094, 095, 096, 097, 098, 099, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000

(4) Nome do Responsável: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Empresa - Empresa

(5) Nome do Responsável: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Empresa - Empresa

(6) Nome do Responsável: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Empresa - Empresa

(7) Nome do Responsável: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Empresa - Empresa

(8) Nome do Responsável: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Empresa - Empresa

(9) Nome do Responsável: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Empresa - Empresa

(10) Nome do Responsável: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Empresa - Empresa

Atividade					
Material	Data	V. Orig.	Data	Intensidade	Nota
1001	20/05/2010	10	20/05/2010	Atividade de Pesquisa Científica	8,27
1002	20/05/2010	10	20/05/2010	Atividade de Pesquisa Científica	8,27
1003	20/05/2010	10	20/05/2010	Atividade de Pesquisa Científica	8,27

# PITIUM-VAC

vacina contra pitiose eqüina

LAPEM/EMBRAPA

**Imunoterápico contra pitiose em eqüinos.**  
**Uso veterinário.**  
**Venda sob receita veterinária.**

Pitium-Vac é um imunoterápico eficiente para o controle da pitiose, doença tumoral dos eqüinos (ferida da moda), que pastejam em locais alagados como beira de lagoas, açudes, pântanos. É causada pelo fungo *Pythium insidiosum* que se desenvolve sobre plantas aquáticas. Pitium-Vac altera a resposta imunitária dos animais doentes, promovendo diminuição e cicatrização dos tumores provocados pelo fungo em 85% dos animais com pitiose clínica.

**FÓRMULA:**  
 Cada embalagem contém:  
 1 frasco com Proteínas liofilizadas do fungo *Pythium insidiosum* ..... 34 mg  
 1 frasco com água bi-destilada, ester. .... 2ml.

**INDICAÇÕES:**  
 Pitium-Vac é indicado para o combate da pitiose (ferida da moda) dos eqüinos, quando os tumores não tiverem mais que 60 dias de seu aparecimento no corpo do eqüino.

O tempo necessário para conferir a imunidade e a duração da mesma é de 14 dias após a aplicação. O tempo mínimo para se obter a cura do animal é de 1 mês e no máximo 10 meses.

#### MODO DE USAR E DOSAGEM

Utilizar 1 frasco reconstituído com 2 mililitros de água estéril e previamente agitado vigorosamente durante 3 minutos. Aplicar todo o conteúdo pela via sub-cutânea na região do pescoço de eqüinos de qualquer idade ou peso. Aplicar o conteúdo de um frasco no intervalo 14 dias entre uma aplicação e outra, até a regressão total dos tumores. Pode aparecer edema na região da aplicação, mas este desaparecerá naturalmente.

#### CONTRA-INDICAÇÕES:

Em eqüinos o produto não possui contra-indicações. Pitium-Vac é um imunoterápico não recomendado para uso em outros animais que não sejam eqüinos.

#### APRESENTAÇÃO:

Frasco de vidro com tampa de borracha e laque metálico com 34 mg de proteínas estéril liofilizadas do fungo *Pythium insidiosum* cepa DMVP118/96 e CBS 1015555.  
 Número de registro no Ministério da Agricultura: 9472 em 09/04/09.

Responsável Técnico: Médico Veterinário Janio Moraes Santurio - CRMV/RS 1663.  
 Fabricado segundo fórmula original pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEM) da Universidade Federal de Santa Maria.  
 Campus UFSM, prédio 20, Departamento de Microbiologia, CEP 97105-900 - Santa Maria - RS, CNPJ Nº 95.991.748/0001-05.

Conservar em temperatura ambiente, em local fresco e ventilado.

