

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

***PYTHIUM INSIDIOSUM*: REVISÃO LITERÁRIA E RELATO DE CASO EM
EQUINO**

Autor: Débora Zaro

PORTO ALEGRE

2013/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

***PYTHIUM INSIDIOSUM*: REVISÃO LITERÁRIA E RELATO DE CASO EM
EQUINO**

Autor: Débora Zaro

**Trabalho apresentado como
requisito parcial para graduação
em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof.º Dr. André
Luiz de Araújo Rocha**

**Coorientador: Prof.º Dr. Carlos
Afonso de Castro Beck**

PORTO ALEGRE

2013/2

Aos amigos e colegas pela motivação e pelo apoio constante. Ao meu orientador e coorientador pela paciência e amizade que tornaram possível a conclusão desta monografia. E aos Médicos Veterinários da Clínica de Grandes Animais do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, por todos os anos de amizade e ensinamentos durante meu período de estagiária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha tia Inocência por ter desde criança me ensinado a amar, a respeitar e a cuidar dos animais, e por ter sido a principal inspiração na minha escolha de me tornar Médica Veterinária. Agradeço aos meus pais e meu irmão pelo suporte e pela colaboração nos momentos de dificuldade.

Com carinho, agradeço as minhas colegas inesquecíveis Carla, Elissandra, Kahena e Neusa pelas palavras amigas nas horas difíceis, pelo auxílio nos trabalhos e provas e principalmente, por estarem sempre comigo nesta longa caminhada, tornando-a mais fácil e agradável. A minha colega Daniela, que também fez parte das minhas escolhas e momentos finais da graduação.

Agradeço aos meus orientadores que foram muito importantes para que este trabalho se concretizasse. Por estarem sempre dispostos a ensinar, pela confiança e conselhos. Obrigada aos Médicos Veterinários, residentes, bolsistas e estagiários da Clínica de Grandes Animais do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, pelos anos de ajuda, de compreensão, de ensinamentos, além dos bons momentos de descontração durante o período em que fui estagiária e bolsista.

Enfim, a todos os colegas, amigos, professores e familiares, que de alguma forma tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido e que, direta ou indiretamente estiveram envolvidos nessa conquista.

*“Encontrei uma bifurcação na floresta. Segui a trilha
menos pisada, e isto fez toda a diferença.”*

(Robert Frost)

RESUMO

A pitiose é uma afecção granulomatosa crônica que acomete equinos e outras espécies como cães, bovinos, caprinos, felinos, animais silvestres e seres humanos. É uma enfermidade de regiões com climas tropicais, subtropicais ou temperados, de áreas com acúmulo de água, banhados e lagoas. O agente etiológico é um oomiceto pertencente ao Reino *Stramenopila*, Filo *Oomycota*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium*, Espécie *Pythium insidiosum*. O microrganismo é um parasita de plantas aquáticas, que através de reprodução assexuada produz zoósporos biflagelados que podem infectar os animais. Causa grandes prejuízos para a equinocultura e o prognóstico da doença depende da extensão das lesões e comprometimento de estruturas como tendões, articulações e tecidos ósseos. Provoca um quadro infeccioso na pele e região subcutânea, porém pode apresentar quadros sistêmicos, pulmonares, gastrointestinais, oculares, entre outros. A enfermidade em equinos caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos, com a presença de massas necróticas denominadas de “kunkers”. Muitos protocolos para tratamento da enfermidade têm sido utilizados, tratamentos químicos, cirúrgicos e de imunoterapia. O tratamento mais indicado para a cura da pitiose em equinos seria à remoção cirúrgica do granuloma combinada com a imunoterapia. O tratamento é complicado devido a características singulares do agente. No caso relatado, constatou-se um tratamento longo, oneroso, com uma série de complicações e reações adversas à imunoterapia. No entanto a terapia foi eficiente na diminuição da lesão e melhora do quadro infeccioso da pele e região subcutânea.

Palavras-chave: equino, pitiose, “kunkers”, imunoterapia, relato de caso

ABSTRACT

Pythiosis is a chronic granulomatous disease that affects horses and other species such as dogs, cattle, goats, cats, wild animals and humans. It is a disease of regions with tropical, subtropical or temperate climates, in areas with accumulation of water, wetlands and ponds. The etiologic agent is an oomycete belonging to the Kingdom Stramenopila, Phylum Oomycota, Class Oomycetes, Order Pythiales, Family Pythiaceae, Genus Pythium, Species Pythium insidiosum. The organism is a parasite of aquatic plants, which through asexual reproduction produces biflagellate zoospores that can infect animals. Cause great harm to the Equine and prognosis of the disease depends on the extent of injuries and impairment of structures such as tendons, joints and bone tissues. Causes an infection in the skin and subcutaneous region, however can present systemic picture, pulmonary, gastrointestinal, ocular, among others. The disease in horses characterized by eosinophilic granuloma formation with presence of necrotic masses called "kunkers". Many protocols for treatment of the disease have been used, chemical, surgical and immunotherapy treatments. The most appropriate treatment for the cure of pythiosis in horses would be the surgical removal of granuloma combined with immunotherapy. Treatment is complicated due to unique characteristics of the agent. In the case reported, there was a long, costly treatment with a series of complications and adverse reactions to immunotherapy. However, the therapy was effective in reducing the injury and the infection of the skin and subcutaneous region.

Keywords: horse, pythiosis, "kunkers", immunotherapy, case report

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação taxonômica do <i>Pythium insidiosum</i>	15
Figura 2 – Esporângio lobulado de <i>Pythium insidiosum</i>	16
Figura 3 – Vesículas com zoósporos após três horas de incubação.....	16
Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura, hifas espessas asseptadas.....	17
Figura 5 – Ciclo ecológico que descreve o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa do <i>Pythium insidiosum</i>	19
Figura 6 – Equinos no Pantanal Matogrossense. Local com acúmulo de água e grande proliferação de plantas aquáticas onde o oomiceto se reproduz.....	20
Figura 7 – “Kunker” retirado da lesão de um equino com pitiose do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS.....	21
Figura 8 – Equino com lesões de automutilação devido ao prurido intenso causado pela infecção por <i>P. insidiosum</i>	22
Figura 9 – Estruturas ósseas com alterações devido à invasão pelo <i>Pythium insidiosum</i> em caso crônico.....	24
Figura 10 – A. Reação inflamatória por eosinófilos que circundam material eosinofílico correspondente a hifas mal definidas (seta). (H.E.40x). B. Hifas septadas coradas em marrom escuro pelo Tricrômico de Gomori. (40x).....	26
Figura 11 – Excisão cirúrgica do tecido de granulação exuberante e dos “kunkers” do membro de um equino.....	29
Figura 12 – Lesão ulcerada com aspecto friável no MPD, região da quartela.....	32
Figura 13 – Imunoterápico “PitiumVac”.....	36
Figura 14 – A. Lesão no primeiro dia de atendimento no HCV. B. Aplicação de sulfato de cobre sobre a ferida. C. Aspecto da lesão logo após a cirurgia de retirada do tecido de granulação.....	38
Figura 15 – Ferida antes do tratamento e após nove meses do tratamento no HCV.....	39
Figura 16 – Sequência cronológica do tratamento clínico e cirúrgico realizado no equino atendido no HCV.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de tratamentos com utilização de imunoterápicos com diferentes processos de fabricação.....	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APCs:** Células Apresentadoras de Antígenos
- COX-1:** Ciclooxygenase 1
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- ELISA:** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- EMBRAPA:** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FC:** Fixação do complemento
- FDT:** Terapia fotodinâmica
- HCV:** Hospital de Clínicas Veterinárias
- H.E:** Hematoxilina-eosina
- ID:** Imunodifusão em gel de Agar
- IgE:** Imunoglobulina E
- IgG:** Imunoglobulina G
- IgM:** Imunoglobulina M
- IL4:** Interleucina 4
- IL5:** Interleucina 5
- IMT:** Imunoterápico
- INF γ :** Interferon gama
- LAPEMI:** Laboratório de Pesquisas Micológicas
- MPD:** Membro posterior direito
- PVPI:** Iodopovidona
- RPMI:** Roswell Park Memorial Institute¹
- SC:** Subcutâneo
- TH0:** Linfócitos T Auxiliar
- TI:** Teste de hipersensibilidade intradérmica
- UFRGS:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- VO:** Via oral

¹ É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Histórico e classificação taxonômica	14
2.2	Aspectos gerais e morfológicos	16
2.3	Etiologia e epidemiologia	18
2.4	Sinais clínicos e apresentações da doença.....	20
2.5	Histologia.....	25
2.6	Diagnóstico	26
2.6.1	Diagnóstico diferencial.....	28
2.7	Tratamento	28
2.7.1	Imunoterapia.....	31
3	RELATO DE CASO	36
3.1	DISCUSSÃO	39
4	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os países tropicais como local endêmico de pitiose equina. Ficomicose era o termo designando as micoses causadas por fungos com hifas grandes e poucos septos, que incluía o gênero causador da pitiose, até então uma doença incurável com indicação de eutanásia do animal.

É uma doença granulomatosa que atinge equinos provocando quadro infeccioso na pele e região subcutânea. Assim como em equinos, os caninos podem apresentar a forma gastrointestinal e cutânea. Bovinos cursam com a doença cutânea, ovinos com quadro de linfangite e lesões cutâneas, felinos e humanos com apresentação de quadro clínico sistêmico, caracterizado por desenvolvimento de arterite, queratite e celulite periorbital. Em humanos, já foram descritos casos de infecção ocular e cutânea por *Pythium insidiosum*, na maioria dos casos em pessoas expostas a fatores de risco como traumatismos oculares, uso de lentes de contato e banhos em água contaminada. A doença é mais prevalente em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas e, causa grandes prejuízos para a equinocultura.

O agente etiológico da pitiose em mamíferos, pertence ao Reino *Stramenopila*, Filo *Oomycota*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium*, Espécie *Pythium insidiosum*. “Nas espécies não domésticas, o *Pythium insidiosum* foi reconhecido como causa de doença pulmonar primária num jaguar da América Central, além de lesões cutâneas e gastrintestinais em um urso de zoológico e, também como causa de lesão mandibular subcutânea em um camelo” (GROOTERS, 2003 apud SANTURIO; FERREIRO, 2008, p.13).

“A enfermidade em equinos caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos, com a presença de massas necróticas denominadas de ‘kunkers’” (MENDONÇA; ALFARO, 1986; MEIRELES et al., 1993; SANTURIO et al., 2003 apud FERREIRO; SANTURIO, 2008, p. 13). Histologicamente nos equinos, os “kunkers” apresentam-se como concreções eosinofílicas de tamanho variado e forma circular com contornos irregulares. Essas concreções são compostas de hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, especialmente eosinófilos. São relatadas duas formas da doença: a forma típica e a forma atípica. Os casos típicos caracterizam-se por granulomas cutâneos, ulcerados, com abundante secreção serossanguinolenta e prurido. Nos casos atípicos são observadas lesões subcutâneas caracterizadas por grandes massas tumorais circunscritas, recobertas por pele escura, sem ulcerações e com pouca secreção. Os caninos são a segunda espécie mais

acometida e, em humanos a doença é comum no Sudoeste da Ásia, principalmente na Tailândia, onde são descritos a maioria dos casos.

Muitos protocolos para tratamento da enfermidade têm sido utilizados, principalmente em equinos, incluindo tratamento químico (antifúngicos); cirúrgicos e de imunoterapia. O tratamento é complicado devido a características singulares do agente. O *Pythium insidiosum* difere dos fungos verdadeiros na produção de zoósporos móveis e na composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto o *Pythium* contém celulose e β -glucanas, o que dificulta a penetração de diversos fármacos. Não existe uma droga antifúngica eficiente contra o *P. insidiosum* e o sucesso das diferentes formas de tratamento é variável, em muitos casos, influenciado pelo tamanho e duração da lesão, idade e estado nutricional do animal.

A imunoterapia surgiu como uma alternativa concreta para o controle da pitiose e tem apresentado resultados animadores. Porém, alguns estudos mostraram que animais que passaram pela primeira infecção e imunoterapia, não desenvolveram uma resposta imunitária suficiente para evitar a reinfecção. O imunoterápico contra pitiose em equinos, “PitiumVac,” com registro de invenção pertencente ao Laboratório de Pesquisas Micológicas da Universidade Federal de Santa Maria (LAPEMI) e Embrapa, mostrou-se eficiente para equinos com pitiose clínica.

Propõe-se neste trabalho uma revisão literária da doença em questão além de, um relato de caso de pitiose diagnosticado em equino no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS – Porto Alegre – em 2013.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico e classificação taxonômica

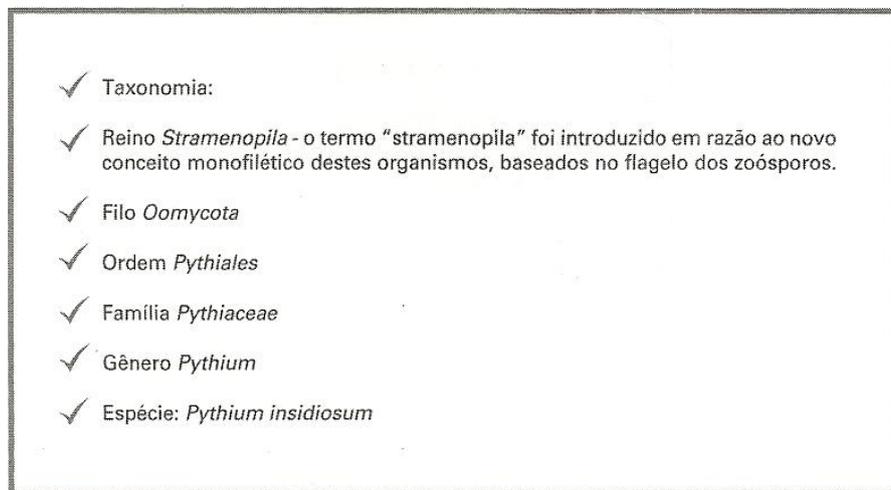
“O agente da pitiose – *Pythium insidiosum* – é, atualmente, classificado como um organismo zoospórico, habitante de solo e de água” (FERREIRO; SANTÚRIO, 2008, p.17). Existem espécies de *Pythium* que atuam como patógenos em plantas, mas o *Pythium insidiosum* é o único dentro deste gênero, reconhecido como patógeno em mamíferos. Manifestações clínicas de pitiose foram, pela primeira vez, diagnosticadas na Índia na metade do século XIX por veterinários ingleses que observaram uma doença granulomatosa cutânea crônica, denominada de “*bursattee*”, um termo derivado de “Burus”, palavra que significa chuva (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). No final do século XIX, a etiologia fúngica, foi proposta por investigadores baseados em dados histopatológicos. No início do século XX, a partir de granulomas cutâneos em equinos na Indonésia, foi realizado o primeiro isolamento do agente. Esse recebeu a classificação como sendo um fungo zigomiceto ou ficomiceto, baseado apenas nas características morfológicas da hifa vegetativa. O nome “*Hyphomyces destruens*” foi proposto para a doença, porém não foi possível classificar o agente etiológico. Somente em 1961, ocorreu o isolamento e identificação do agente, o qual baseado no nome da doença sugerido anteriormente foi denominado de *Hyphomyces destruens* (SANTURIO; FERREIRO, 2008).

Em 1964, o termo ficomicoses foi sugerido para designar as micoses humanas e animais, causadas por fungos com hifas grandes e poucos septos, que incluía o gênero *Hyphomyces*. Em 1974, foi realizado o isolamento e a caracterização mais detalhada do agente etiológico a partir de equinos infectados originários da Nova Guiné, onde foi observado a sua capacidade de produzir zoósporos biflagelados. A partir desta característica, o *Hyphomyces destruens* foi classificado como um fungo da família *Pythiaceae*, ordem *Peronosporales* e que deveria ser incluído no gênero *Pythium*. Em 1980, foi comparado um isolado de equino com outras espécies de *Pythium*, por meio de suas características reprodutivas (oogônias e zoósporos), identificando o agente como *Pythium gracile*. E somente em 1987, através da análise de isolados de equinos, bovinos, cães, e humanos oriundos de diferentes locais, concluiu-se que se tratava do mesmo organismo, que foi denominado *Pythium insidiosum*. Nessa mesma análise, “concluiu-se que essa nova espécie era igual às anteriormente descritas, *Pythium* sp. – Austwick e Copland; *Pythium gracile* – Ichitani e Amemiya; e *Hyphomycoses destruens* – Bridges e Emmons” (FERREIRO; SANTÚRIO,

2008, p. 19). Também em 1987, uma nova espécie foi descrita *Pythium destruens*, de um isolado de equinos na Austrália. Porém, em 1989, provas sorológicas demonstraram o mesmo perfil antigênico do *Pythium insidiosum*, estabeleceu-se então, a nomenclatura definitiva para o agente etiológico da pitiose: *Pythium insidiosum*.

“Embora o nome do agente tenha sido estabelecido, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes” (FERREIRO; SANTÚRIO, 2008, p. 19). Estudos detalhados sobre a classificação dos fungos, baseados em sistemática filogenética e análises moleculares, entre outros, classificaram os fungos em três reinos: *Fungi*, *Stramenopila* e *Protista*. Baseado nessa nova classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao reino *Stramenopila*, classe *Oomycetes*, ordem *Pythiales*, família *Pythiaceae*, gênero *Pythium* e espécie *P. insidiosum*.

Figura 1 – Classificação taxonômica do *Pythium insidiosum*.



Fonte: SANTÚRIO; FERREIRO, 2008, p.20.

Estudos taxonômicos mais aprofundados, baseados em análises de sequenciamento de gene do RNA ribossomal de *P. insidiosum*, confirmaram que os membros da classe *Oomycetes* são filogeneticamente distantes dos membros do reino *Fungi* e estariam relacionados de maneira mais próxima das algas que dos fungos. A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos está retratada ao nível celular através de diferenças na parede e composição de membranas. A quitina, um componente essencial da parede fúngica, está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, onde aparecem como componentes predominantes, celulose e β -glucana. Os oomicetos também diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular. Nos oomicetos o ergosterol não é o principal esteróide, já nos fungos o

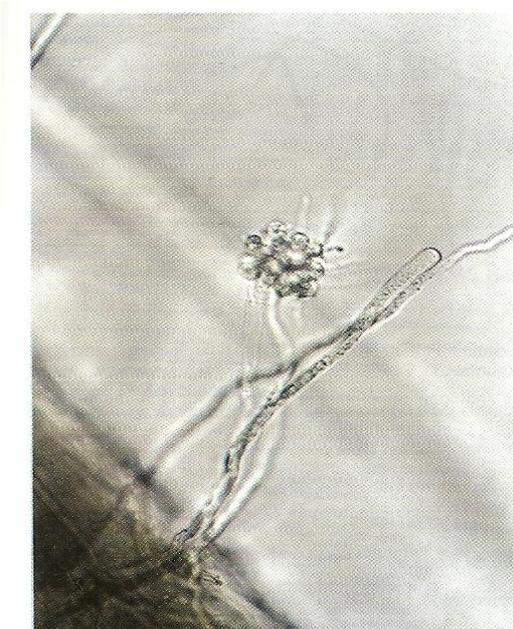
ergosterol é importante para a integridade e manutenção da função da membrana celular. As espécies do gênero *Pythium* incorporam os esteróides do ambiente (auxotróficos), enquanto os fungos o produzem. Os esteróides não são necessários para o crescimento da hifa vegetativa, mas são importantes para a produção de estruturas sexuadas *in vitro* (FERREIRO; SANTÚRIO, 2008).

Estudos demonstraram diferenças genéticas entre isolados de *P. insidiosum*, levando à conclusão de que possam existir algumas variedades ou subespécies de *P. insidiosum*, ou até mesmo de espécies, que possam estar causando quadros clínicos de pitiose em animais e humanos em diversos continentes.

2.2 Aspectos gerais e morfológicos

O gênero *Pythium* possui mais de 120 espécies distribuídas em todo planeta, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas, ocasionando severos prejuízos nas lavouras. Enquanto que apenas a espécie *P. insidiosum* é conhecida como patógeno de mamíferos. A identificação das espécies de *Pythium* não é uma tarefa fácil, e está baseada principalmente nas características morfológicas dos zoosporângios, zoósporos, oogônias e anterídeos.

Figura 2 - Esporângio lobulado de *Pythium insidiosum*.



Fonte: SANTURIO; FERREIRO, 2008, p.25.

Figura 3 - Vesículas com zoósporos após três horas de incubação.



Fonte: GAASTRA, 2010, p. 10.

Os gêneros pertencentes ao filo *Oomycota*, caracterizam-se por:

- a) produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada;
- b) reprodução sexuada oogâmica;
- c) possuir uma parede celular composta de β -glucanas, celulose e hidroxiprolina;
- d) talo diplóide;
- e) mitocôndria com crista tubular;
- f) rota alternativa para síntese do aminoácido lisina.

Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura, hifas espessas asseptadas.



Fonte: MOSBAH et al., 2012, p.166.

Comparações entre 28 espécies de *Pythium insidiosum* provenientes das Américas, Ásia e Austrália, através da verificação do espaço ribossomal intergênico por técnicas moleculares e análises dos “clusters”², mostraram haver diferenças entre os isolados das três regiões estudadas. Levantando-se a hipótese da necessidade de ocorrer uma reclassificação

² Conjunto de genes que codificam para a mesma proteína.

como subespécies, pois cada “*cluster*” dos isolados representa populações geneticamente distintas.

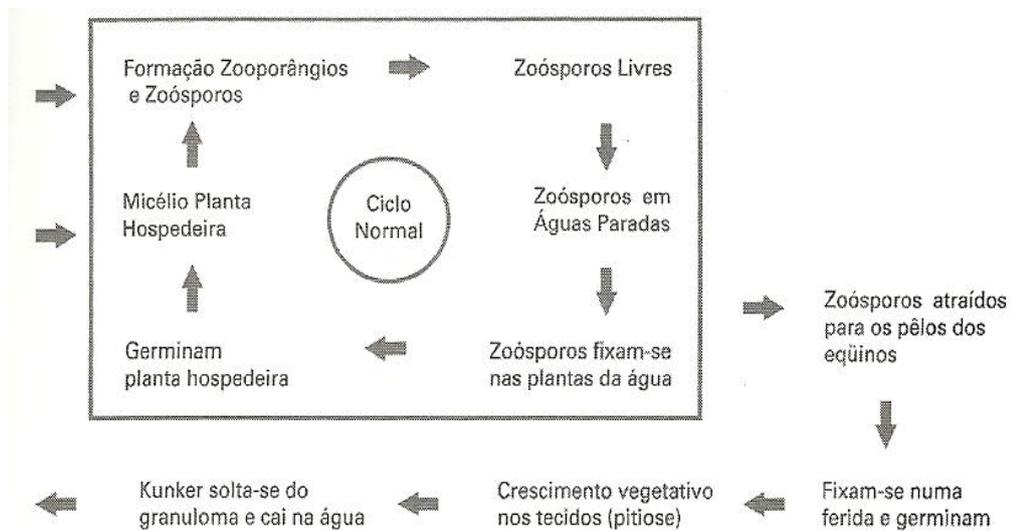
2.3 Etiologia e epidemiologia

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático, responsável pela etiologia da pitiose, uma doença crônica e frequentemente observada em equinos. As condições climáticas e ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo que ocorre em locais de clima tropical, subtropical e temperado; locais com acúmulo de água, banhados e lagoas. Temperaturas entre 30 e 40°C são necessárias para a produção de zoósporos. O local com a maior incidência e prevalência da pitiose equina no mundo é o Pantanal brasileiro, mas em todas as regiões do país já foram constatados casos da doença (FERREIRO; SANTÚRIO, 2008; MORAES, 2013). Nas Américas, em alguns países europeus, Sudeste Asiático, Oceania e África, já foram relatados casos. Mosbah et al. (2001), descreveram casos de pitiose em equinos no Egito que eram utilizados pelos agricultores para o plantio de arroz. No Egito a maioria dos casos ocorre entre os meses de junho a agosto, meses de verão e calor, quando os campos de arroz são plantados.

Casos clínicos são observados durante todo o ano, mas a maioria coincide com épocas de maior precipitação pluviométrica, acometendo animais de todas as idades, sexo ou raças, sem predisposição. Não há relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e humanos, embora já tenham sido relatados casos de pitiose em humanos, sendo os zoósporos ambientais a fonte de infecção. Alguns autores acreditam que possa haver um período de incubação de até algumas semanas.

Miller propôs, em 1983, um ciclo ecológico descrevendo o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa do oomiceto:

Figura 5 – Ciclo ecológico que descreve o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa do *Pythium insidiosum*.



Fonte: SANTÚRIO; FERREIRO, 2008, p. 29.

As plantas aquáticas servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo. Os zoósporos ficam livres na água, quando encontram uma planta (ou animal) se ligam a superfície do hospedeiro e se encistam emitindo um tubo germinativo, dando origem a um novo micélio. Os zoósporos possuem uma quimiotaxia por pelos, tecidos animais e vegetais. Mendoza, Hernandez e Ajello (1993) relataram em estudo que o processo de encistamento e formação do tubo germinativo foram mais rápidos quando tecidos de humanos, animais ou plantas estavam presentes. Portanto, os cavalos em contato com a água contaminada, poderiam atrair os zoósporos. Os zoósporos podem penetrar através do folículo piloso ou se aderir a lesões na pele. Também se observa animais com diferenças na suscetibilidade à infecção.

No Brasil, já foram relatados casos de pitiose em várias espécies, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em equinos. Há casos descritos na literatura e relatos de Médicos Veterinários em várias regiões do país, sendo o Pantanal brasileiro o local de maior incidência e prevalência de pitiose equina no mundo. “Embora não exista um levantamento preciso da incidência e prevalência da enfermidade no Brasil, a mesma representa um problema à equinocultura, especialmente em regiões alagadas como o Pantanal Matogrossense” (MENDONZA et al. 1996 apud PEREIRA et al., 2012, p. 866).

Estudos realizados por Zanette et al. (2013), confirmaram uma possível afinidade do *P. insidiosum* com o ferro. Na Tailândia 1% da população é talassêmica o que explica o caráter endêmico da pitiose nessa população, já que a talassemia tem sido associada com a pitiose humana. Essas pessoas possuem uma sobrecarga de ferro e, essa sobrecarga poderia aumentar à susceptibilidade do hospedeiro à pitiose devido ao comprometimento das células T e das células fagocíticas. Os estudos realizados por Zanette et al. (2013), são os primeiros a envolver a deficiência de ferro como uma causa primária ou contributiva de anemia em infecção experimental por *Pythium insidiosum* em coelhos. No entanto, para entender melhor o papel dos íons de ferro e a capacidade de ligação do ferro em infecções por *P. insidiosum*, níveis de ferro no sangue, transferritina e ferritina, estes devem ser estudados em outras espécies animais para verificar se o ferro pode vir a representar um bom marcador de prognóstico em pitiose. Os resultados de tratamentos atuais de pitiose com quelantes de ferro ainda são pobres e devem ser investigados.

2.4 Sinais clínicos e apresentações da doença

As regiões baixas dos equinos, extremidades distais dos membros, porção ventral da parede toracoabdominal e cabeça, são geralmente as regiões mais acometidas pelo *Pythium insidiosum*, devido ao maior contato com a água contaminada com zoósporos.

Figura 6 - Equinos no Pantanal Matogrossense. Local com acúmulo de água e grande proliferação de plantas aquáticas onde o oomiceto se reproduz.



Em 2009, Vaz et al. relataram um caso atípico de pitiose nasal em equino que provavelmente se contaminou com a água de bebida. Inicialmente o animal apresentava sangramento nasal, posteriormente observaram-se nódulos na mucosa que sangravam e se assemelhavam a feridas cobertas por crostas. Apesar da presença de epistaxe de pouca expressividade, nódulos ulcerados que sangravam, não havia comprometimento da respiração e o animal não apresentava desconforto nem baixa no desempenho atlético. As lesões se apresentavam em ambas as narinas e o equino não apresentava sinais clínicos como prurido, secreção mucossanguinolenta e lesões subcutâneas. Como peculiaridade deste caso, em algumas situações a infecção pode não estar associada ao contato físico prolongado com água contaminada, podendo estar associada à água de bebida. Portanto, devendo essa também ser controlada em locais em que se conhece a presença do oomiceto para evitar a contaminação dos animais.

As lesões apresentam um aspecto granulomatoso, com exsudato mucoseroso e apresentam-se úmidas. Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões subcutâneas ulcerativas, com formação de grandes massas teciduais com bordas irregulares, muitas vezes com aparência tumoral. A presença de “kunkers” também é característica da doença. São massas branco-amareladas formadas por hifas recobertas por células necróticas, com tamanho que varia de 2 a 10 mm de diâmetro e, possuem um formato irregular, com aspecto arenoso. Ao se pressionar a lesão, consegue-se extrair com facilidade os “kunkers”.

Figura 7 - “Kunker” retirado da lesão de um equino com pitiose do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS.



A extensão das lesões depende do local acometido e da duração da infecção. Podem conter secreções serossanguinolentas, mucossanguinolentas, hemorrágicas e mucopurulentas. A presença de exsudato serossanguinolento e odor fétido podem ser sugestivos de contaminação secundária por outros microrganismos. Os ferimentos causam prurido intenso e os equinos com pitiose podem mutilar a lesão na tentativa de aliviar o desconforto.

Figura 8 - Equino com lesões de automutilação devido ao prurido intenso causado pela infecção por *P. insidiosum*.



Fonte: DIAS et al., 2012, p. 3.

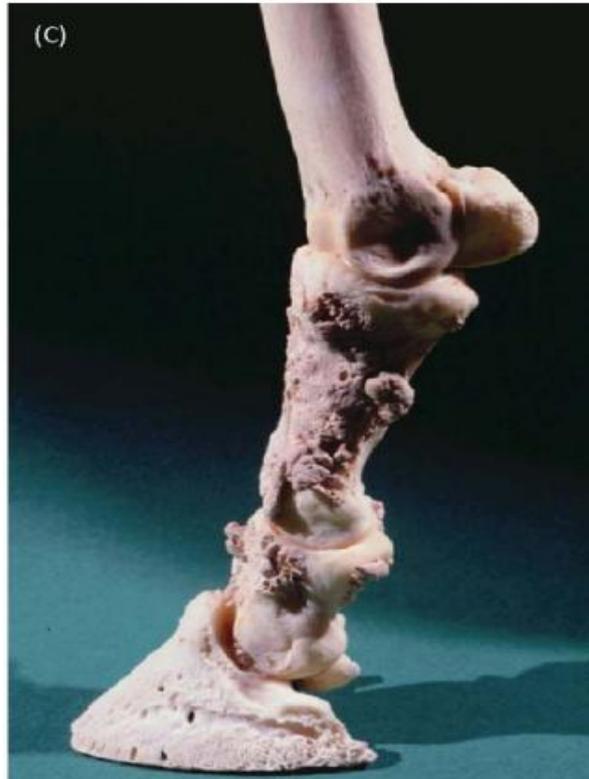
Alguns animais podem apresentar claudicação. Também a pitiose pode disseminar-se para órgãos internos, principalmente em pulmões e fígado já foram detectadas a presença do agente. A pitiose intestinal é a segunda forma mais frequente da infecção pelo *Pythium insidiosum* em equinos. Os animais com pitiose intestinal podem apresentar distúrbios gastrointestinais, provocados por massas tumorais que podem levar a distensões, impactações e cólicas intestinais. Conforme descrito por Viscardi et al. (2009), um caso de pitiose intestinal em equino, o paciente apresentava-se deprimido, com frequência cardíaca e frequência respiratória aumentadas, mucosas cianóticas e hipomotilidade intestinal. O paciente foi submetido à cirurgia e, constatou-se o comprometimento do mesentério, aumento de líquido peritoneal e uma massa disforme que atingia as serosas e mucosas intestinais. O

prognóstico foi considerado reservado, havia ampla área de desvitalização do intestino delgado e, o equino foi submetido à eutanásia. Os achados histológicos confirmaram a presença do agente *P. insidiosum* confirmando o diagnóstico de pitiose intestinal. Nesse caso, a via de infecção foi desconhecida, no entanto, sugeriu-se como possibilidade de contaminação a ingestão de água com a presença do oomiceto. Apesar da pitiose intestinal não ser a forma mais comum da apresentação da doença, ela pode ser considerada como um diagnóstico diferencial quando em uma exploração abdominal houver a presença de massas amorfas envolvendo as paredes intestinais.

Casos atípicos de pitiose também são relatados, esses animais apresentam lesões deformantes, mas há pouca secreção, não há ulcerações e o tecido granulomatoso apresenta-se recoberto por pele escura e espessada. “Segundo consta, somente no pantanal brasileiro são registradas essas formas bizarras da pitiose nos equinos” (SANTURIO; FERREIRO, 2008, p. 37).

Além das formas de pitiose cutânea e intestinal, outros órgãos e tecidos podem ser acometidos secundariamente às lesões cutâneas. Já foram relatados casos de cavalos com lesões cutâneas crônicas e com muita proliferação de tecido granulomatoso, que apresentavam lesões ósseas. As lesões ósseas são caracterizadas por exostoses, osteólises e osteomielite no exame radiológico. Há relatos da necessidade de eutanásia em animais acometidos pela doença com envolvimento do tecido ósseo. Também já foram descritos casos de metástases via sistema linfático para pulmões e linfonodos regionais. Na maioria dos casos, os animais com pitiose apresentam os linfonodos regionais aumentados. Já foi possível isolar o agente etiológico de “Kunkers” localizados em linfonodos atingidos. Animais com lesão na cernelha também apresentaram linfangite.

Figura 9 - Estruturas ósseas com alterações devido à invasão pelo *Pythium insidiosum* em caso crônico.



Fonte: GAASTRA et al., 2010, p. 5.

O prognóstico da doença depende da extensão das lesões e comprometimento de estruturas como tendões, articulações, tecidos ósseos. Os animais podem apresentar prurido e, portanto, dilacerar a ferida causando sangramento e agravando as lesões. Alguns animais também podem apresentar emagrecimento, inapetência, dor e prostração. Pode ocorrer acentuada caquexia e mortes entre três e sete meses após o início dos sinais (ÁLVAREZ; VILORIA; AYOLA, 2013). “Anemia e leucocitose com neutrofilia são achados frequentes em doenças debilitantes crônicas, comuns em processo inflamatórios de etiologia fúngica” (SANTOS et al., 2011, p. 4). Hematócrito baixo é observado em animais com pitiose em decorrência da perda de sangue através das feridas. Dependendo da localização das lesões, extensão e grau de claudicação, pode haver animais com sintomas de desidratação devido à dificuldade para se levantar, locomover, alimentar e ingerir água adequadamente.

2.5 Histologia

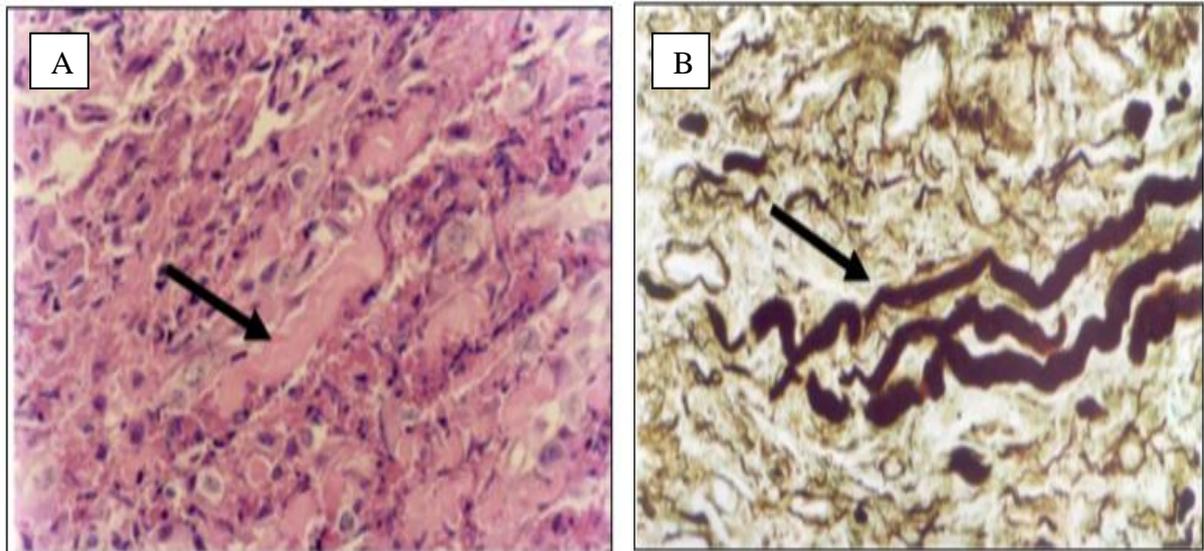
Histologicamente os “kunkers” são concreções eosinofílicas de tamanhos variados, formatos circulares e contornos irregulares. Fazem parte dessas concreções, hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, principalmente eosinófilos. Os eosinófilos apresentam-se degranulados próximos às hifas e, em direção à periferia, os grânulos tornam-se mais evidentes. Usando-se a coloração especial de prata, é possível visualizar nos cortes histológicos as hifas com paredes espessas, raras septações e ramificações irregulares, em geral encontradas no interior dos focos de mineralização. No caso de pitiose nasal em equino relatado em 2009, por Vaz et al., foram coletados fragmentos com cerca de 0,2-0,3 mm de dois nódulos de cada antímero nasal, os quais foram acondicionados em formalina tamponada 10%. Lâminas histológicas foram confeccionadas e coradas por hematoxilina-eosina (H.E) e Tricrômico de Gomori.

Microscopicamente, nos cortes corados pela H.E, observou-se descontinuidade do epitélio com hiperplasia pseudo-carcinomatosa que se aprofundava no tecido granulomatoso proliferado. Havia neste tecido, infiltração por considerável quantidade de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e histiócitos (VAZ. et al., 2009, p.30).

Em áreas mais superficiais foi possível observar necrose, hemorragias e presença de fibrina. Mais profundamente, observaram-se áreas de necrose com debris celulares e em algumas áreas imagens negativas mal definidas circundadas por infiltrado composto predominantemente por eosinófilos. No entanto, essas imagens não permitiram a confirmação do diagnóstico, sendo necessária a realização de coloração por métodos histoquímicos que evidenciassem os fungos.

Os cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Gomori evidenciaram a presença de hifas de paredes espessas, esparsamente septadas, sem ramificações e medindo cerca de dois a seis milímetros, características do *Pythium insidiosum* (Vaz et al., 2009, p.30).

Figura 10 - **A.** Reação inflamatória por eosinófilos que circundam material eosinofílico correspondente a hifas mal definidas (seta). (H.E.40x). **B.** Hifas septadas coradas em marrom escuro pelo Tricrômico de Gomori. (40x).



Fonte: VAZ et al., 2009, p. 30.

Nas formas de pitiose intestinal, pode-se encontrar tecido conjuntivo fibroso com áreas de necrose e focos de mineralização, macrófagos, neutrófilos degenerados e infiltrados eosinofílicos. Não foram encontrados “kunkers” nos casos de pitiose intestinal.

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da pitiose é realizado através da história clínica, achados histopatológicos e isolamento do agente. Porém, esses métodos não são muito eficientes para a identificação precoce da enfermidade. Nos casos crônicos o diagnóstico é mais fácil, enquanto que nos casos com lesões cutâneas iniciais ou com infecções sistêmicas, o diagnóstico se torna mais difícil por métodos tradicionais. A identificação de isolados de *Pythium insidiosum* pode ocorrer por meio do aspecto da colônia e na característica das hifas. Atualmente, métodos como imuno-histoquímica e técnicas sorológicas auxiliam num diagnóstico precoce e correto. O diagnóstico, por exemplo, pode ser confirmado pela detecção de anticorpos específicos pelo teste de ELISA. As técnicas de imunodifusão em gel de Agar (ID), fixação do complemento (FC) e teste de hipersensibilidade intradérmica (TI) foram testados por Miller e Campbell em 1982. Gerando como resultado diagnóstico positivo 100%

para ID, 82% para FC e 64% para TI. Os dados comprovam que o teste de ID apresenta alta sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos anti-*P. insidiosum*. Já o teste de FC é menos sensível e específico do que o teste de ID, além de ser um teste difícil de realizar e requerer experiência do laboratorista.

Em 1997, foi desenvolvido um teste de ELISA para o sorodiagnóstico da pitiose em humanos e animais que utilizava o antígeno solúvel de hifas sonificadas. Resultados de testes indicaram que o teste de ELISA é eficiente para o diagnóstico de pitiose, possui especificidade semelhante ao teste de ID, porém com melhor sensibilidade (FERREIRO; SANTÚRIO, 2008).

Kunkers podem ser removidos por meio de biópsia e encaminhados a um laboratório de pesquisas micológicas para se realizar o isolamento do agente etiológico da pitiose. O acréscimo de antibióticos à amostra é recomendado, pois o crescimento bacteriano contamina a amostra e dificulta as chances de isolamento do *P. insidiosum* dos tecidos. A identificação do agente pode ser realizada através da visualização do aspecto da colônia e das características das hifas (FERREIRO; SANTÚRIO, 2008; PEREIRA 2008, JUNIOR; NOGUEIRA, 2002).

Os meios de cultura Agar V8 (suco de tomate), Sabouraud dextrose e Agar farinha de milho não produzem estruturas reprodutivas. De acordo com Tondolo (2013), o crescimento de micélios do *Pythium insidiosum* não ocorre ao redor de discos de 30 µg de minociclina em encubação a 35C° por sete dias; crescem em Sabouraud de farinha de milho, Mueller-Hinton ou RPMI Agar. Já o crescimento dos fungos não é inibido pelos discos de minociclina. Essa técnica oferece um método simples e rápido de diferenciação entre o *P. insidiosum* e filamentos fúngicos. A técnica de difusão em disco é barata, simples e rápida, no entanto, é recomendado que o diagnóstico da pitiose seja confirmado por histopatologia e testes sorológicos. “A identificação definitiva do *P. insidiosum* ainda requer técnicas de genotipagem” (TONDOLO, 2013, p. 53).

O cultivo em folhas de grama estéreis sobre Agar água 2% com incubação a 37°C pelo período de 18 a 24 horas, permite que os zoósporos se reproduzam (zoosporogênese). Após, as folhas infectadas com *P. insidiosum* são colocadas em solução de sais minerais diluída a 1%. Os zoósporos crescem após 2 a 4 horas de incubação a 37°C, a partir de hifas terminais. “A utilização de protocolos de indução da zoosporogênese em *Pythium insidiosum* é o ponto crucial nos estudos que envolvem este oomiceto” (PEREIRA et al., 2008, p.144). Se o material estiver muito contaminado por outros fungos e ou bactérias, pode não ser possível induzir a zoosporogênese.

2.6.1 Diagnóstico diferencial

O quadro agudo da doença pode ser confundido com habronemose cutânea, dermatoses, lesões com abundante tecido de granulação, neoplasias, granulomas fúngicos e bacterianos.

A suspeita de habronemose é muito difundida entre técnicos e tratadores, principalmente quando a localização da lesão ocorre na face e abdômen inferior. Dada à similitude macroscópica, é essencial subsidiar abordagens clínicas com exames complementares (SANTOS et al., 2011, p. 4).

Em casos de pitiose ocular em humanos, os sintomas e lesões podem ser confundidos com queratite micótica.

2.7 Tratamento

Muitos protocolos para tratamento da enfermidade têm sido utilizados, principalmente em equinos, incluindo tratamento químico (antifúngicos); cirúrgicos e de imunoterapia. O tratamento é complicado devido a características singulares do agente. O *Pythium insidiosum* difere dos fungos verdadeiros na produção de zoósporos móveis e na composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto o *Pythium* contém celulose e β -glucanas. A membrana plasmática do *Pythium insidiosum* não possui esteróides, como o ergosterol, que é o componente alvo das drogas antifúngicas, portanto os antifúngicos não são eficientes para o tratamento da enfermidade. “A falta de uma terapia adequada para a pitiose tem incentivado a busca de novas propostas” (ARGENTA et al., 2012, p. 140). Como descrito por Dória (2009), o sucesso das diferentes formas de tratamento é variável e, depende do tamanho da lesão, local e duração da lesão, idade e estado nutricional do animal afetado. Antibioticoterapia pode ser utilizada para minimizar as infecções secundárias bacterianas. Cocos-bastonetes Gram negativos e células leveduriformes já foram isoladas de lesões de animais com pitiose. As infecções secundárias dificultam o tratamento da doença e o isolamento do agente. A morte de muitos animais pode estar associada à liberação de fatores de necrose tumoral, essa liberação ocorre em infecções por bactérias Gram negativas. “A causa do óbito é geralmente associada ao choque toxêmico causado pela infecção sistêmica secundária por bactérias Gram negativas, associada à perda contínua de sangue e proteínas pela ferida” (POOLE; BRASHIER, 2003; REI; NOGUEIRA, 2002 apud DIAS et al., 2012, p.6).

Os gêneros de *Pythium* que causam doenças nos vegetais são sensíveis aos inseticidas normalmente utilizados nas plantações, porém esses inseticidas são tóxicos aos mamíferos o que impossibilita seu uso como alternativa de tratamento. O tratamento cirúrgico é o procedimento mais utilizado. No entanto, este se torna difícil em função da localização das lesões, que geralmente acometem os membros dos animais, sendo difícil realizar a retirada de toda a região afetada com uma boa margem de segurança. Portanto, a intervenção cirúrgica é mais eficiente em lesões pequenas, superficiais, onde seja possível a retirada de toda a área acometida. O tratamento químico associado à remoção cirúrgica demonstra melhores resultados. Compostos iodados como o iodeto de potássio e sódio também são descritos na literatura como alternativas de tratamento.

Figura 11 - Excisão cirúrgica do tecido de granulação exuberante e dos “kunkers” do membro de um equino.



Fonte: DÓRIA, R.G.S., 2009, p. 41.

As drogas mais utilizadas são: anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol, além dos compostos iodados. Resultados de tratamentos clínicos e de testes *in vitro* apresentaram diversidades. Os antifúngicos cetoconazol, fluconazol e miconazol inibiram isolados de *P. insidiosum* testados *in vitro*. Já os poliênicos anfotericina B, hamicina e seus análogos não apresentaram resultados satisfatórios. Porém, relatos de tratamentos em humanos com anfotericina B demonstraram resultados satisfatórios, contrariando os resultados obtidos *in vitro*. Descrições de casos de pitiose em cães demonstraram que o

tratamento antifúngico não foi eficaz na cura da enfermidade. “Além disso, antifúngicos sistêmicos são pouco eficazes, nefrotóxicos e de custo elevado” (DIAS et al., 2012. p.2). Quando do uso de agentes antifúngicos sistêmicos, recomenda-se fazer a monitorização da função renal a cada 72 horas, através de urinálise e concentração sérica de uréia e creatinina, bem como a verificação da hidratação, devido à nefrotoxicidade desses agentes. Também há o risco de desenvolvimento de tromboflebite jugular decorrente da forte irritação endotelial que pode ser causada pela administração intravenosa desses fármacos. Anfotericina B pode ser utilizada de forma tópica em queratomicoses por possuir penetração rápida nos tecidos e menor toxicidade. O uso tópico de soluções de anfotericina B em dimetilsulfóxido (DMSO) pode aumentar a absorção do antimicótico. Dias et al. (2012), relataram o tratamento de um equino com pitiose cutânea de localização atípica. Inicialmente realizou-se excisão cirúrgica e cauterização da lesão granulomatosa localizada no flanco esquerdo. Posteriormente ao ato cirúrgico, instituiu-se um tratamento essencialmente tópico, incluindo limpeza da ferida com iodopovidine aquoso, irrigação com solução fisiológica seguida de solução contendo 50 mg de anfotericina B, 10 mL de água estéril e 10 mL de DMSO, duas vezes ao dia, por 64 dias. O tratamento combateu o agente da infecção, *P. insidiosum*, favoreceu a cicatrização da ferida e o crescimento dos pelos.

A perfusão regional intravenosa com anfotericina B, associada à excisão cirúrgica, também é uma alternativa já descrita em experimentos como uma terapêutica viável e eficaz. Conforme Martínez (2004 apud DÓRIA, 2009, p.17) “a perfusão regional é uma técnica que consiste na infusão de uma substância em uma região do organismo isolada vascularmente da circulação sistêmica”. Um fármaco é aplicado em uma determinada região anatômica, sem difundir-se pela circulação sistêmica temporariamente.

A administração conjunta de um anestésico local e de um antibiótico, em uma mesma perfusão regional, permite, ao mesmo tempo, a administração de um antibiótico para o tratamento da infecção e a realização de um debridamento cirúrgico dos tecidos afetados, sem anestesia geral (HAUCK-BAUER, 1977; STANEK et al., 1984 apud DÓRIA, 2009, p. 17).

Novas técnicas de administração local e regional de medicamentos têm sido desenvolvidas afins de que, permitam alcançar altas concentrações no local da infecção, enquanto as concentrações sistêmicas se mantenham abaixo do grau de toxicidade da substância. Permitindo assim, o emprego de fármacos cuja administração sistêmica em cavalos seria economicamente inviável.

A terbinafina é uma alilamina sintética antifúngica que é comumente utilizada na Medicina Humana e Veterinária. Terapia oral com terbinafina em humanos é indicada em

casos de dermatofitoses. Na veterinária é eficaz para o tratamento de dermatofitoses em gatos, cavalos e cães. Ela tem sido utilizada em infecções por *P. insidiosum* em equinos e humanos e em geral, tem baixo índice de toxicidade e efeitos adversos. Em um estudo de concentração inibitória mínima contra isolados de *P. insidiosum*, a terbinafina teve o melhor efeito em comparação ao itraconazol e ao variconazol. “Outro estudo descobriu que a administração oral de terbinafina, mais uma solução saturada de iodeto de potássio e anfotericina B, obteve sucesso no tratamento da forma cutânea da pitiose” (LAOHAPENSANG et al., 2009 apud ARGENTA et al., 2012, p. 141).

A terapia fotodinâmica (FDT) que utiliza a interação de um fotossensibilizador, luz e oxigênio, causando morte celular, é uma alternativa nova de tratamento para a pitiose equina. Estudos comparando a utilização da FDT *in vitro* e *in vivo* mostraram que a técnica foi eficaz na inativação do oomiceto *P. insidiosum* e, que o desenvolvimento de células resistentes ao tratamento é improvável de acontecer. Na FTD um corante reage com um comprimento de onda específico, resultando na produção de oxigênio molecular no local alvo. O corante, que é o fotossensibilizador, absorve luz e inicia reações fotodinâmicas que transferem energia para moléculas de oxigênio, transformando-as em uma forma de oxigênio reativo que é tóxico para células provocando a morte destas. A utilização da técnica apresenta várias vantagens: o tratamento localizado pode ser repetido quantas vezes forem necessárias, é eficaz contra *P. insidiosum* e não depende da saúde do animal. Como desvantagem a técnica apresenta penetração de luz limitada, necessitando debridagem cirúrgica antes do procedimento se houverem grandes massas teciduais.

O uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio, após remoção cirúrgica das lesões em equinos, apresentou sucesso nos resultados. Segundo Hubert e Grooters (2012), o tratamento mais indicado para a cura da pitiose em equinos, seria a ressecção cirúrgica total do granuloma combinada com imunoterapia específica para *P. insidiosum*.

2.7.1 Imunoterapia

Em 1981, Miller produziu imunoterápico utilizando macerado de hifas sonificadas acondicionadas em frascos, a partir da cultura do próprio agente. O índice de eficácia do tratamento imunoterápico, associado à cirurgia foi de 53 e 75%. No decorrer dos anos, outros autores utilizaram a técnica proposta por Miller, porém com algumas modificações, como a utilização do sobrenadante das culturas como antígeno, massa celular como antígeno e o

antígeno solúvel concentrado. A imunoterapia surgiu como uma alternativa concreta para o controle da doença e tem apresentado resultados animadores. Porém, alguns estudos mostraram que animais que passaram pela primeira infecção e imunoterapia, não desenvolveram uma resposta imunitária suficiente para evitar a reinfecção.

O coelho é a espécie animal utilizada como modelo nos testes de drogas e imunoterapia contra a pitiose por ter sido a única espécie na qual foi possível reproduzir pitiose cutânea por meio da inoculação de zoósporos gerados por zoosporogênese induzida em laboratório. Eles são sensíveis à inoculação de zoósporos (FERREIRO; SANTÚRIO, 2008). A infecção pode ser confirmada pela técnica de ELISA .

O Laboratório de Pesquisas Micológicas da Universidade Federal de Santa Maria (LAPEMI) desenvolveu juntamente com a Embrapa Pantanal, um imunoterápico contra a pitiose em equinos, que vem sendo utilizado desde 1993. O imunoterápico (IMT) com denominação “Pitium-Vac” mostrou-se eficiente no tratamento contra a Pitiose equina e, em estudo de mestrado (MONTEIRO, 1999), o índice de cura variou de 50 a 83,3%.

Figura 12 - Imunoterápico “Pitium-Vac”.



Imunoterápico contra pitiose nos equinos “PitiumVac” com registro de invenção pertencente ao LAPEMI/UFSM e Embrapa.

Fonte: SANTURIO; FERREIRO, 2008, P. 14.

A imunoterapia é uma ferramenta terapêutica utilizada em várias áreas da Medicina e Biologia. Uma grande vantagem é que os produtos são liofilizados, gerando imunoterápicos com prazo de validade longo, acima de um ano.

Um estudo realizado por Tomich (2010) avaliou o impacto econômico decorrente do controle da pitiose equina determinado pelo emprego do imunoterápico Pitium-Vac, e verificou que ao longo dos anos de 2003 a 2009, o uso dessa tecnologia apresentou uma ascendência. Segundo Tomich (2010), “o uso do PITIUM-VAC foi capaz de gerar renda adicional por cada animal tratado variando de R\$ 461,01 no ano de 2005 a R\$ 733,24 no ano de 2008”. O trabalho indica que antes do lançamento do Pitium-Vac havia um elevado índice de descarte de animais acometidos pela enfermidade, e que o uso do imunoterápico agrega valor aos animais tratados, pois apresenta alta eficiência na cura dos animais com pitiose. O estudo apontou dados que mostraram o potencial da tecnologia para geração de impacto econômico positivo sobre o agronegócio do cavalo. O aumento no benefício econômico pela adoção do IM foi determinado pelo crescimento da sua utilização e pela valorização dos equinos de serviço notada nos anos de 2007 a 2009 (TOMICH, 2010).

Até o momento, não há um conhecimento completo sobre os mecanismos envolvidos na infecção por *Pythium insidiosum*. Miller (1981) relatou que mesmo as hifas sendo antigênicas, estas não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro devido à acentuada reação inflamatória. Por enquanto, as possíveis explicações para a cura induzida pela imunoterapia, baseiam-se em características clínicas, histopatológicas e sorológicas da infecção e do tratamento. Alguns autores acreditam que a cura pela imunoterapia esteja baseada principalmente nos mecanismos de resposta celular, devido às alterações teciduais ocorridas após o início do tratamento. Também se verificou que o nível de anticorpos anti-*Pythium* aumenta em equinos que são submetidos à imunoterapia e, isto auxiliaria na cura. Experimentos mostraram também, que o uso de adjuvantes utilizados nos imunoterápicos pode prolongar e potencializar a sua atuação.

Um estudo realizado por vários autores (MILLER, 1981; MENDOZA e ALFARO, 1989; MONTEIRO e SANTURIO, 1999; MENDOZA et al., 2003) testou os efeitos de imunoterápicos fabricados através de diferentes processos, obtendo resultados diversos.

Tabela 1 - Resultados de tratamentos com utilização de imunoterápicos com diferentes processos de fabricação.

Processo de fabricação de imunoterápicos contra a Pitiose	Quantidade de animais testados (n)	Doses utilizadas (n)	Cura (%)
Hifas sonificadas	30 equinos	3	53
Antígenos solúveis	5 equinos	3	60
Hifas liquidificadas ou maceradas liofilizadas	110 equinos	6	83
Antígeno solúvel + hifas sonificadas	18 equino	3	72
Antígeno solúvel + hifas sonificadas	6 cães	4	33

Fonte: SANTURIO; FERREIRO, 2008, p. 69.

Estudos comparativos entre imunoterápicos sonificados, imunoterápicos mistos (50% IMT sonificado, 50% IMT macerado) e IMTs macerados, apresentaram resultados positivos para os IMTs macerados, com diminuição significativa das lesões causadas pela infecção por *P. insidiosum*. Enquanto os outros IMTs mostraram resultados desfavoráveis, com aumento das lesões durante o tratamento. Os processos de fabricação dos imunoterápicos também são muito importantes e causam variações significativas nos resultados dos tratamentos, isso infere na importância de se realizar uma padronização dos processamentos de produção.

No ano de 2003, foi apresentada hipótese para os efeitos curativos da imunoterapia contra pitiose baseada em dados de equinos e humanos. Essa hipótese sugere que quando os zoósporos do *P. insidiosum* entram em contato com a ferida do hospedeiro, formam um tubo germinativo que penetra no tecido. As hifas liberam exoantígenos no tecido do hospedeiro que atraem as células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs fazem a liberação de IL4 (Interleucina 4) que estimula a atração de Th0 (Linfócitos T auxiliares), os quais estimulam linfócitos Th2, estes induzem a produção de IL4 e IL5. As IL4 fazem a regulação da expressão de Th1 e estimulam as células B a produzirem IgE, IgM e IgG que podem ser detectadas por testes diagnósticos. Eosinófilos e mastócitos são mobilizados para o local da lesão através da estimulação das IL5 e IgE. Os eosinófilos e mastócitos são responsáveis pelas lesões teciduais, essas células degranulam sobre as hifas do *P. insidiosum* desenvolvendo nos equinos, os “kunkers”. Dentro dos “kunkers” as hifas se multiplicam, produzindo exoantígenos em grandes quantidades, processo que pode resultar no bloqueio à resposta imune devido ao Th2. Os Th2 mobilizam eosinófilos e mastócitos, que induzem somente ao

desenvolvimento de “kunkers”, formando uma capa eosinofílica que protege as hifas do ataque do sistema imune celular impedindo a regressão da estrutura granulomatosa. Quando a imunoterapia é realizada no hospedeiro com pitiose, os antígenos presentes nas suas APCs são diferentes dos que estão presentes no imunoterápico. Interferon gama ($\text{INF } \gamma$) é liberado pelas APCs e ativam Th0 para Th1. O Th1 quando ativado libera mais $\text{INF } \gamma$ e IL2. Logo, $\text{INF } \gamma$ e IL2 ativam linfócitos e macrófagos que danificam e destroem as hifas do *P. insidiosum*. Não se sabe ao certo, se as IL2 e $\text{INF } \gamma$ também estimulam linfócitos B para produção de IgG protetoras durante imunoterapia. No entanto, a produção de $\text{INF } \gamma$ no local da infecção resulta numa menor transformação de Th2. A atração de Th1 e diminuição de Th2 podem explicar porque os hospedeiros infectados pelo *P. insidiosum* são curados após aplicações de imunoterápicos. Uma resposta imune eficiente contra os fungos e oomicetos ocorre então, através da ação de linfócitos T auxiliares, através de resposta celular.

3 RELATO DE CASO

Um equino, macho, não castrado, pesando 270 kg no dia da consulta, sem raça definida e de aproximadamente dez anos de idade, foi conduzido ao Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em março de 2013. O animal apresentava uma lesão ulcerada com aspecto friável no membro posterior direito (MPD), na região da quartela.

Figura 13 - Lesão ulcerada com aspecto friável no MPD, região da quartela.



Segundo o relato do proprietário, a lesão inicialmente se assemelhava a uma verruga pequena que cresceu e evoluiu para uma ferida ulcerada que causava prurido no paciente. De acordo com o relato do proprietário, o equino ficava solto em um campo alagado e nunca havia apresentado lesão semelhante.

Inicialmente, o proprietário utilizou um ectoparasiticida³ em aerossol, que possui ação larvicida, bernicida, repelente, cicatrizante, antisséptico além de efeito adstringente e hemostático, cujos princípios ativos são sulfadiazina de prata e cipermetrina, é um produto de

³ Bactrovet Prata AM, fabricante König A.S.

uso exclusivamente externo. Também aplicou sobre a ferida pomada⁴ com ação anti-infecciosa, epitelizante e cicatrizante que contém agentes antimicrobianos que atuam no combate de micro-organismos que podem estar presentes em infecções dermatológicas. Tem ação sobre o epitélio auxiliando na manutenção e regeneração, devido à presença de vitamina A na formulação do fármaco. É um produto de uso externo que apresenta em sua composição: gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A. Dois frascos de antimicrobiano e anti-inflamatório⁵ foram aplicados pelo proprietário, 10 ml no lado direito do pescoço e, 10 ml no lado esquerdo do pescoço. O fármaco é uma associação injetável entre antimicrobianos e anti-inflamatório não hormonal, à base de benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, estreptomicina e piroxicam, indicada para bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Não houve melhora do paciente com estes tratamentos.

No Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, realizou-se a limpeza da lesão, coleta de amostras de sangue para hemograma e material da lesão para exame histopatológico. Não houve alterações significativas nos exames laboratoriais, e o resultado do exame histopatológico confirmou o diagnóstico de pitiose. Soro antitetânico foi administrado como profilaxia. A limpeza da ferida foi realizada com solução fisiológica e povidine degermante, em seguida realizado curativo com gase, calêndula, atadura e esparadrapo para proteger a ferida. Também se utilizou anti-inflamatório não esteroide⁶, não narcótico que possui potente ação analgésica, antitérmica e anti-endotóxica.

De março a agosto, uma série de procedimentos foi tomada para realizar o tratamento do paciente. Inicialmente foi realizada antibioticoterapia para combater infecções secundárias bacterianas. Dez doses do imunoterápico Pitium-Vac por via subcutânea, com intervalo de quinze dias entre uma aplicação e outra foram administradas. Todas as aplicações causaram desconforto no paciente, com formação de abscessos contendo secreção purulenta, edema e muita dor. O equino apresentou eritropenia, portanto recebeu uma suplementação via oral de biotina e zinco. Sulfato de cobre foi aplicado sobre a lesão antes da excisão cirúrgica do tecido de granulação exuberante, para auxiliar na diminuição do tamanho da massa tecidual. Foi feita a higienização diária da ferida com solução fisiológica e PVPI, e aplicada pomada de calêndula sobre a lesão. O paciente recebeu iodeto de potássio via oral por dois meses, após o uso foi cancelado, pois o equino apresentou alterações no exame clínico que levaram a suspeita de intoxicação pelo antifúngico. No entanto, as alterações apresentadas como

⁴ Vetaglós, fabricante Vetnil.

⁵ Megacilin Super Plus, fabricante Agener União Saúde Animal.

⁶ Flunixin, fabricante Chemitec Agro-Veterinária.

claudicação, ataxia e dor, foram causadas pelo desconforto no local da aplicação das doses do imunoterápico. Durante o tratamento o equino recebeu fluidoterapia, pois apresentou desidratação. Protetor podal cujo princípio ativo é o alcatrão, também foi utilizado como profilaxia e tratamento de patas machucadas e cascos quebradiços.

Figura 14 - **A.** Lesão no primeiro dia de atendimento no HCV. **B.** Aplicação de sulfato de cobre sobre a ferida. **C.** Aspecto da lesão logo após a cirurgia de retirada do tecido de granulação.



Figura 15 - Ferida antes do tratamento e após nove meses do tratamento no HCV.



A sequência mais detalhada dos tratamentos realizados no HCV se encontra no item apêndice.

3.1 Discussão

O antimicrobiano⁷ utilizado no tratamento do equino reúne em sua composição cinco antibióticos com ação predominantemente bactericida: estreptomicina, benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina. A antibioticoterapia é um importante aliado do tratamento, pois diminui a ocorrência de infecções secundárias que muitas vezes dificultam o sucesso do tratamento da doença. Mendoza e Alfaro (1986) descreveram cinco casos crônicos de pitiose em equinos que culminaram em morte devido à toxemia generalizada, devido à grande contaminação bacteriana nas lesões. Também citam que a imunoterapia apresenta melhores resultados nas fases iniciais, e não na fase crônica em que há uma maior destruição de tecidos devido à contaminação por bactérias nas lesões.

⁷ Pentabiótico Veterinário Reforçado, fabricante Fort Dodge.

O paciente recebeu um suplemento líquido⁸, de administração via oral, que combina em sua formulação vitaminas e oligoelementos que participam direta ou indiretamente do metabolismo celular, principalmente de células sanguíneas e outras de rápida multiplicação. A formulação do suplemento é composta por: Vitamina B1, Vitamina B2, Vitamina B12, Vitamina B6, Vitamina K3, Pantotenato de Cálcio, Ácido Fólico, Ácido Nicotínico, Cobre, Zinco, Ferro, Cobalto e Glicose. É indicado no manejo nutricional na recuperação de animais que apresentam anemia. De acordo com Santos et al. (2011), a anemia e leucocitose com neutrofilia são achados frequentes em doenças debilitantes crônicas, comuns em processo inflamatórios de etiologia fúngica.

O sulfato de cobre atua como antisséptico e adstringente, ajudando assim a combater a infecção. Conforme Barquero, Higuero (2006), o sulfato de cobre de uso tópico tem ação adstringente, é abrasivo, antisséptico, fungicida e tem ação de secagem. A dipirona sódica é utilizada para dores musculares, cólicas, processos inflamatórios, febres e após intervenções cirúrgicas. Conforme Melo et al.(2009), os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE's), como a fenilbutazona, são considerados a melhor opção para o tratamento das alterações do sistema musculoesquelético, bem como nas afecções gastrintestinais que cursam com endotoxemia.

A administração do Iodeto de Potássio foi cancelada, pois o equino passou apresentar alterações no exame clínico, e suspeitou-se de intoxicação pelo antifúngico, no entanto as alterações foram em decorrência de reações adversas à aplicação do imunoterápico. Dória et al. (2008), descreve que a intoxicação por iodo raramente é relatada em equinos. Segundo a autora, cavalos têm uma alta sensibilidade ao iodo e relata um caso, em que o uso excessivo de medicamento à base de iodo, em equino adulto, causou alterações físicas, clínicas, comportamentais e hormonais compatíveis com um quadro de hipotireoidismo.

A administração de omeprazol foi realizada como profilaxia já que o equino estava recebendo fenilbutazona⁹, segundo Melo et al. (2009), os antiinflamatórios não-esteroidais geram diversos efeitos colaterais. As drogas que inibem predominantemente a COX-1 estão associadas ao maior risco de hemorragias, tanto pela inibição na síntese de tromboxano A2, como pela possibilidade de causarem lesões na mucosa gastrointestinal.

O equino diversas vezes apresentou-se apático, com claudicação, devido à dor intensa causada pela reação das aplicações do IMT, como formação de abscessos com secreção purulenta e edema no local de aplicação. Não se alimentava e não ingeria água

⁸ Hemolitan, fabricante Vetnil.

⁹ Artridine, fabricante Virbac.

adequadamente, apresentando desidratação, portanto foi necessária a realização de fluidoterapia e também de cloridrato de tramadol para alívio da dor.

A pomada de calêndula tem ação cicatrizante e antisséptica, é indicada no tratamento de lesões superficiais como feridas e ulcerações dérmicas em cães, gatos, equinos e bovinos. Também é indicada no tratamento de queimaduras, escaras e úlceras de decúbito, contusões e pisaduras, cortes acidentais e ou, cirúrgicos. Durante muitos séculos, a calêndula tem sido utilizada para tratar desde lesões cutâneas de tuberculose até mesmo sífilis. Possui uma capacidade para acelerar a cicatrização da pele, alivia dor, inchaço e possui propriedades antimicrobianas (TILFORD, 2007).

No presente estudo, optou-se por utilizar no texto o termo “imunoterápico” assim como Santos et al. (2011), Gaastra et al. (2010) e Tomich (2010) . Embora alguns autores (SANTURIO; FERREIRO, 2008; CAMPOS et al. 2013; SEPPA, 2007; MENDOZA; NICHOLSON; PRESCOTT, 1992) tenham empregado a denominação “vacina”, o medicamento não possui ação preventiva contra a doença, e é administrado como tratamento de animais diagnosticados com pitiose.

4 CONCLUSÃO

Com esses dados, se observou no caso relatado um tratamento extenso, demorado e oneroso, que acarretou em uma série de complicações, reações adversas, formação de abscessos e edema no local de aplicação do imunoterápico, suspeita de intoxicação por iodeto de potássio, dor e baixa qualidade de vida do paciente. No entanto, a associação do tratamento cirúrgico à administração de antimicóticos, antimicrobianos e imunoterapia aumenta a eficácia do tratamento. A terapia empregada foi eficiente na diminuição da lesão, o processo cicatricial evoluiu e a ferida encontra-se quase que totalmente fechada e coberta por pelos. O processo de reparação das feridas causadas pelo oomiceto geralmente é lento, complicado e, resulta em perdas significativas devido ao considerável número de animais que se encontram impossibilitados de exercer sua função, desenvolvimento de extenso tecido de granulação, claudicação, edemas perilesionais e prognóstico muitas vezes negativo das lesões.

A enfermidade requer atenção especial em razão da dificuldade do tratamento e risco que representa para a vida de animais e humanos afetados. Novas perspectivas estão abertas para o estudo da pitiose e seu controle. O aperfeiçoamento da imunoterapia, a produção de uma vacina e não apenas de um imunoterápico, permitirá que os animais desenvolvam uma proteção preventiva contra a doença por determinado período de tempo, a busca por drogas antifúngicas eficientes e, possível utilização de inseticidas que não sejam tóxicos aos mamíferos, são desafios a serem alcançados. Como *Pythium insidiosum* não é um fungo verdadeiro, portanto, não responde bem aos tratamentos antifúngicos, a busca por terapia química adequada para Pitiose deve continuar.

Pouco se sabe sobre a virulência do agente e espera-se que o conhecimento sobre a patogenicidade do *P. insidiosum* venha a aumentar quando a sequência completa de nucleotídeos do seu genoma estiver disponível. Em comparação a outros agentes infecciosos, a biologia molecular da patogenicidade do *P. insidiosum* ainda não está bem desenvolvida, assim, continua sendo um agente de grande interesse de estudos e que causa significativas perdas e prejuízos na Medicina Veterinária.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, J. C.; VILORIA, M. V.; AYOLA S. P. Pitiose cutânea em equinos: uma revisão. **Revista CES Medicina Veterinária y Zootecnia**, Medellín, v. 8, n.1, p. 58-67, jan./jun. 2013.
- ARGENTA, J. S. et al. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v.157, n. 1-2, p.137–142, May 2012.
- BARQUERO, S.C.; HIGUERO, F. L. P. Cobre sulfato 1/1.000 solución tópica. **Offarm**, v. 25, n. 02, p. 125-127, feb. 2006.
- CAMPOS et al. Associação da vacina pitium-vac® na remoção cirúrgica de pitiose (*Pythium insidiosum*) em equino: relato de caso. **Semana Nacional de Educação Continuada em Medicina Veterinária**, Alegre, maio 2013.
- DIAS, D. P. M. et al. Pitiose cutânea equina de localização atípica tratada topicamente com solução de anfotericina B e DMSO. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n.4, p. 1088, 2012.
- DÓRIA, R.G. S. et al. Hipotireoidismo iatrogênico em equino decorrente de excesso de iodo: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.521-524, 2008.
- DÓRIA, R. G. S. Tratamento da pitiose em membros de equinos por meio de perfusão regional intravenosa com anfotericina B. 2009. 113 f. **Dissertação (Doutorado em Cirurgia Veterinária)** - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1-2, p. 1-16, Nov. 2010.
- JIMÉNEZ, M. C. C. Infección Ocular por *Pythium insidiosum*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 2, p. 118-122, 2013.
- JUNIOR, J. L. R.; 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, n. 4, p. 358-365, jul./ago. 2002.
- KELLER, K.A. Therapeutic Review: Terbinafine. **Journal of Exotic Pet Medicine**, California, v. 21, n. 2, p. 181-185, Apr. 2012.
- LEAL, A. B. M. et al. Pitiose Equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 151-156, out./dez. 2001.
- MACIEL, I. C. F et al. Pitiose fatal em equino tratado inicialmente para habronemose cutânea. **Acta Scientiae Veterinariae**, Campos Montes Claros, v. 36, n. 3, p. 293-297, 2008.

MELO, U. P. et al. Intoxicação por fenilbutazona em equino: relato de caso. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.2, p.111-116, 2009.

MENDOZA, L. e ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**, Escuela de Medicina Veterinaria, National University, Heredia, v. 94, n. 2, p. 123-129, 1986.

MENDOZA, L.; HERNADEZ, F.; AJELLO, L. Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2967-2973, nov. 1993.

MENDOZA, L.; NICHOLSON, V.; PRESCOTT, J.F. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 2980-2983, Nov. 1992.

MORAES A. S. et al. Impactos Econômicos, Sociais e Ambientais de Tecnologias da Embrapa Pantanal. 2. Pitium-Vac – Imunoterápico Contra Pitiose Equina. **Embrapa**, 1ª ed. Corumbá, p.37, abr. 2013.

MOSBAH, E. et al. Diagnosis and Surgical Management of Pythiosis in Draft Horses: Report of 33 Cases in Egypt. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n.3, p. 164-169, Mar. 2012.

PEREIRA, C. M. et al. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 865-868, set. 2012.

PEREIRA, D. I. B. et al. Zoosporogênese in vitro entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.143-147, jan./fev. 2008.

PEREIRA, D. I. B. Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Pythium insidiosum*: Estudo comparativo entre acetato de caspofungina e imunoterapia em coelhos. 2008. 117 f. **Dissertação (Tese de Doutorado)** – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

PIRES, L. et al. Photodynamic therapy for pythiosis. **Veterinary Dermatology**, v.24, n. 1, p. 130-e30, Feb. 2013.

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

SANTOS, C. E. P. et al. Does Immunotherapy Protect Equines from Reinfection by the Oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 18, n. 8, p. 1397-1399, Aug. 2011.

SANTOS, C. E. P. et al. Eficácia da imunoterapia no tratamento de pitiose facial em equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 1, p. 955, 2011.

SANTÚRIO, J. M; FERREIRO, L. **Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008. 111 p.

SEPPA et al. Pitiose cutânea em equino e associação das terapias cirúrgica, medicamentosa e vacinal – relato de caso. VIII **Conferência Anual da ABRAVEQ**, São Paulo, ago 2007.

TILFORD, G. Count on calendula: this safe and common herb is famed for its ability to soothe and heal. **Whole Dog Journal**, v.10, n. 2, p.16, Feb. 2007.

TOMICH, T. R. et al. Impacto Econômico Decorrente do Controle da Pitiose Equina Empregando- se o Imunoterápico PITIUM-VAC. **5º Simpósio Sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal**, Corumbá, MS, 9 a 12 de nov. 2010.

TONDOLO, J. S. M. et al. A simple rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, n. 1, p. 52-54, Apr. 2013.

VAZ, B.U. et al. Pitiose nasal em equino. **Medicina Veterinária** , Recife, v.3, n.4, p.27-32, out./dez. 2009.

VISCARDI, V. et al. Equine Intestinal Pythiosis – A case report. In: **11th International Congress of World Equine Veterinary Association**, 24-27 Sept. , 2009, Guarujá.

ZANETTE, A. R. et al. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. **Veterinary Microbiology**, v.162, n. 2-4, p. 826–830, Mar. 2013.

ZANETTE, A. R. Variações no perfil enzimático de isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. 2010. 55 f. **Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias)** - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

APÊNDICE

Figura 16 – Sequência cronológica do tratamento clínico e cirúrgico realizado no equino atendido no HCV.

Data	Procedimentos e tratamentos realizados
12/03	Aplicação de dois frascos de Pentabiótico Reforçado, 12.000.000UI, 30 ml.
14/03	Aplicação de dois frascos de Pentabiótico Reforçado, 12.000.000UI, 30 ml.
16/03	Aplicação de dois frascos de Pentabiótico Reforçado, 12.000.000UI, 30 ml.
18/03	Data de início do uso de Hemolitan – 20 ml/dia, pois o paciente apresentava eritropenia.
20/03	Aplicação de sulfato de cobre na ferida para auxiliar na diminuição do tecido de granulação. Realização de exame diagnóstico Raio-X que não apresentou alterações.
28/03	Aplicação da 1ª dose do IMT Pitium-Vac, SC.
11/04	Realização de cirurgia para remoção de tecido de granulação exuberante, aplicação de soro antitetânico, administração de 5,5ml de Flunixin, três frascos de Pentabiótico Reforçado e 14 ml dipirona sódica. A partir desta data, iniciou-se a limpeza diária, duas vezes ao dia, do ferimento com PVPI, aplicação de pomada de calêndula e administração de Flunixin por sete dias.
12/04	Aplicação da 2ª dose do IMT Pitium-Vac, via SC, início do uso Iodeto de Potássio, composto que possui ação antifúngica, 20g VO/dia e dipirona sódica 14 ml.
13/04	Administração de três frascos Pentabiótico Reforçado, 18.000.000UI, 45 ml. A 2ª dose do IMT foi administrada no músculo peitoral e causou uma reação com formação de abscessos, secreção purulenta, edema e dor, o equino passou a apresentar sintomas de claudicação. Administrou-se então, 6 ml de fenilbutazona por 3 dias.
26/04	Aplicação da 3ª dose do IMT Pitium-Vac, SC.
10/05	Aplicação da 4ª dose do IMT Pitium-Vac, SC.
24/05	Aplicação da 5ª dose do IMT Pitium-vVac, SC.
07/06	Aplicação da 6ª dose do IMT Pitium-Vac, SC.

08/06	O paciente apresentou alterações no exame clínico, como ataxia, claudicação e dor; no hemograma, eritropenia e fibrinogênio com valores aumentados. Foi realizada fluidoterapia. Em decorrência da formação de abscessos e edema no local de aplicação do IMT, o animal passou a claudicar e sentir muita dor, então se administrou fenilbutazona por oito dias.
09/06	Último dia de administração de Iodeto de Potássio, pois se pensou que as alterações no exame clínico e hemograma pudessem ser em decorrência de uma suposta intoxicação pela administração do antifúngico, no entanto foram causadas pela intensa dor nos locais de aplicação do IMT.
12/06	Administração de cloridrato de tramadol 5,8ml, pois o paciente apresentava muita dor.
13/06	Início da administração de omeprazol 7g, VO.
21/06	Realização de fluidoterapia e aplicação da 7ª dose do IMT Pitium-Vac, SC.
23/06	Realização de fluidoterapia.
26/07	Detectada a presença do protozoário intra- eritrocitário <i>Babesia equi</i> em exame sanguíneo. Início de tratamento para babesiose com: dipropionato de imidocarb ¹⁰ , 4,8 ml (2,4ml pela manhã e 2,4ml à tarde) e transfusão de sangue, pois o paciente apresentava eritropenia.
28/06	Administração de dipropionato de imidocarb, 4,8 ml (2,4ml pela manhã e 2,4ml à tarde).
30/06	Administração de dipropionato de imidocarb, 4,8 ml (2,4ml pela manhã e 2,4ml à tarde).
05/07	Aplicação da 8ª dose do IMT Pitium-Vac, SC.
19/07	Aplicação da 9ª dose do IMT Pitium-Vac, SC.
02/08	Aplicação da 10ª dose do IMT Pitium-Vac, SC. Todas as aplicações do IMT causaram reações com formação de abscessos contendo secreção purulenta, edema, causando muita dor no paciente e claudicação.

¹⁰ Imizol, fabricante Intervet Schering-Plough