UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LAYLA PIRES

Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* – estudo *in vitro* e *in vivo*

São Carlos
2012

LAYLA PIRES

Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* – estudo *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pires, Layla

Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* - estudo in vitro e in vivo / Layla Pires; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
146 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Pitiose. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Controle microbiano. 4. Porfirina. 5. Clorina. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

Aos meus avôs (*in memoriam*),
aos meus pais, Ramiro e Rosangela,
ao meu namorado, Paulo Augusto,
pela incansável dedicação, amor e incentivo.

*“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas,
que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
E que valeu a pena”*

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ramiro e Rosangela, pelo apoio e incentivo incondicional. Muito obrigada por todo o amor e carinho!

Ao meu namorado, amigo e companheiro Paulo Augusto, por incentivar e apoiar o meu amor à pesquisa. Agradeço todo o amor e suporte para que eu pudesse concluir mais esta etapa em minha vida.

À minha família sempre presente em minha vida! Muito obrigada pelo apoio e carinho.

À Prof^a. Cristina Kurachi por me aceitar como sua aluna e acreditar no meu trabalho. Muito obrigada pela chance de desenvolver este projeto e por me ensinar que ciência é construída com ética e dedicação. Mais importante que isso, eu agradeço sua amizade e carinho.

Ao Prof. Vanderlei Salvador Bagnato pelo amor à pesquisa e todos os ensinamentos que me fizeram uma pessoa e pesquisadora melhor.

À Profa. Sandra de Moraes Gimenes Bosco que me deu de presente o *P. insidiosum*. Muito obrigada por me acompanhar desde a iniciação científica, por todos os ensinamentos da microbiologia e mais importante que tudo isso, muito obrigada pela amizade e carinho.

Ao Prof. Kleber Thiago de Oliveira da Universidade Federal de São Carlos, pela síntese da clorina e6 e orientação da parte bioquímica.

Ao Nelson Ferreira da Silva Junior, responsável pelo biotério da Bioengenharia e um grande amigo e companheiro. Muito obrigada por me acompanhar em todos os experimentos com os coelhos, pela paciência e pela amizade. Serei eternamente grata.

Às amigas Lilian e Hilde, pelo carinho, apoio e todos os momentos maravilhosos que passamos juntas. Namastê!

Aos amigos do Laboratório de Biofotônica que me ajudaram a concluir este trabalho: Alessandro, Bruno, Clóvis, Dirceu, Hilde, Lilian, Marciana, Michelle, Natália, Patrícia, Paulinha e Sebastião.

A todos do Laboratório de Biofotônica, muito obrigada!

Ao Professor Francisco Guimarães por todo auxílio no microscópio confocal e pelas imagens maravilhosas do *P. insidiosum*.

Ao Professor Diomedes Barbosa Neto por acreditar no nosso trabalho e nos permitir avaliar o tratamento nos cavalos com pitiose na Universidade Federal do Pará em Castanhal. Muito obrigada pela oportunidade!

A todos do Grupo de Medicina Equina da Universidade Federal do Pará, muito obrigada pela recepção e apoio.

Ao Professor Delphim da Graça Macoris da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp/Jaboticabal Unesp, por confiar no nosso trabalho e permitir que avaliássemos a técnica em égua com pitiose.

Aos proprietários dos animais que confiaram no nosso trabalho e permitiram que tratássemos seus animais. Muito obrigada.

Aos animais que participaram deste projeto, coelhos e cavalos. Infelizmente não pudemos salvá-los todos, mas definitivamente pudemos aprender muito e aprimorar a técnica. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro, Processo 2010/02890-5.

“We live in evolutionary competition with microbes (bacteria, viruses, fungi and protozoa). There is no guarantee that we will be the survivors.”

*Joshua Lederberg
(23/05/1925-02/05/2008)*

RESUMO

PIRES, L. **Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum*** – estudo *in vitro* e *in vivo*. 2012. 146p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica baseada na interação entre uma substância fotossensibilizadora e luz, na presença do oxigênio, para causar morte celular. Sob iluminação de comprimento de onda específico, o fotossensibilizador é excitado e reage com oxigênio celular, dando origem a espécies reativas de oxigênio capazes de promover danos a biomoléculas da célula-alvo. O mesmo processo ocorre para micro-organismos, como bactérias, vírus e fungos. A Pitiose é uma doença causada por um micro-organismo semelhante a fungo denominado *Pythium insidiosum*. Por não ser um fungo verdadeiro, o agente não apresenta ergosterol em sua membrana plasmática e por isso, não responde à maioria das drogas antifúngicas disponíveis. Procedimentos cirúrgicos extensos, como amputação de membros, são indicados; porém as recidivas são frequentes. Neste trabalho, foi avaliado o efeito da TFD em modelo *in vitro*, em infecção experimental de pitiose e em pitiose equina. Além disso, foram realizados ensaios de cinética dos fotossensibilizadores utilizados, porfirina, clorinas e azuleno. As taxas de inibição de crescimento *in vitro* do *P. insidiosum* foram superiores a 95% para os ensaios com Photodithazine[®]. Photogem[®] apresentou inativação satisfatória e o azul de metileno se mostrou ineficiente para a inativação do patógeno. A cinética comprova os resultados obtidos *in vitro*, e revelou possível afinidade das clorinas com o oomiceto. Dez minutos após a incubação em solução de Photodithazine[®] e clorina e6 foi possível observar os compostos em estruturas intracelulares específicas. Para maiores tempos de incubação, a distribuição destes compostos se dá por toda a hifa e parede celular. O Photogem[®] mostrou distribuição heterogênea na cultura. Este fato explica o crescimento de algumas hifas após a TFD. O azul de metileno não penetrou na célula microbiana e por isso não foi eficiente na inativação do patógeno. Ao observar a estrutura morfológica da hifa do patógeno após a TFD com diferentes tempos de incubação, ficou evidente que a TFD é mais eficiente para maiores tempos de incubação. Apenas o azul de metileno não inativou o patógeno

em nenhum dos parâmetros avaliados. Os estudos em pitiose experimental mostraram que o Photodithazine[®] concentra-se na lesão 4 horas após a administração por via endovenosa, o que não foi observado para o Photogem[®]. Altas fluências e intensidades luminosas foram necessárias para o tratamento das lesões. Foram avaliados 21 coelhos com aproximadamente 95% de cura. O tratamento de equinos naturalmente infectados mostrou resultados animadores. Foram avaliados quatro cavalos, realizando-se apenas duas sessões de TFD em cada animal e foi possível observar regiões de cicatrização tecidual e recuperação da função motora dos animais. Mais uma vez as clorinas mostraram maior eficiência quando comparadas aos outros fotossensibilizadores. Além disso, observou-se a relação entre os tempos de incubação e resposta tecidual que condizem aos observados no estudo farmacocinético. O protocolo para o tratamento da pitiose, provavelmente basear-se-á em tempos de incubação do composto maiores que 1 hora, altas fluências e intensidades luminosas e clorinas como agente fotossensibilizador. Neste trabalho, a TFD mostrou potencial terapêutico e pode vir a se tornar uma importante ferramenta no tratamento da pitiose.

Palavras-chave: Pitiose. Terapia fotodinâmica. Controle microbiano. Porfirina. Clorina.

ABSTRACT

PIRES, L. **Photodynamic therapy of *Pythium insidiosum* inactivation** – *in vitro* and *in vivo* study. 2012. 146p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012

Photodynamic Therapy (PDT) is a therapy based on the interaction of photosensitizer and light, in the presence of oxygen, to induce cellular death. Under the incidence of light, at an appropriated wavelength, these chemical compounds produce reactive oxygen species which affects the biomolecules of the target-cells. Pythiosis is a life-threatening emerging disease caused by a fungus-like organism called *Pythium insidiosum*. Since it is not a true fungus, this microorganism does not present ergosterol in its plasmatic membrane, and so, does not respond satisfactorily to most antifungal drugs. Extensive surgical debridements are required, such as limb amputation, however, recurrence frequently occurs. In this study the PDT effect was investigated in an *in vitro* model, experimental *in vivo* infection and naturally occurred equine pythiosis. Besides, pharmacokinetic assays with chlorine, porphyrin and methylene blue were also carried out. It was observed inhibition rates greater than 95% for chlorine, while porphyrin showed satisfactory inhibition and methylene blue was inefficient to inactivate the pathogen. Pharmacokinetics assays corroborate with obtained *in vitro* results and demonstrated a possible affinity between chlorine and oomycetes. After ten minutes of incubation, for both chlorine and chlorin e6 solutions, it was observed that these compounds were concentrated in intracellular specific structures. For longer incubation times the distribution of these compounds was observed along the hyphae and cellular wall. Porphyrin has shown heterogeneous distribution on cell culture. This fact may explain hyphal growth observed after PDT with this photossensitizer. Methylene blue was present only in the cell surface and so, did not inhibit the pathogen. By observing the morphological structure of the pathogen after PDT with different incubation times, it was evident that PDT is more efficient when employing longer incubation times. Only methylene blue did not inactivate the pathogen in none of the evaluated protocols. Concerning experimental infection, it was observed that chlorine concentrates in lesion 4 hours after intravenous administration, while the same was not observed for porphyrin. High light doses and irradiances were necessary for treating the lesions. It was evaluated 21

rabbits with complete response around 95%. The treatment of naturally infected equines showed promising results. Four horses were treated with two PDT sessions. Treated regions of healing and recovery of motor function of the animals were observed. Once again, chlorins showed improved results when compared to the other photosensitizers. Besides, it was observed the relation between incubation time and tissue response correlated to those observed in the kinetics study. The protocol for treating pythiosis, probably will be based on chlorine incubation time greater than 1 hour, high light dose and irradiance, that the results of the present study demonstrate that PDT is a potential treatment option for pythiosis.

Keywords: Pythiosis. Photodynamic therapy. Microbial control. Porphyrin. Chlorine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) Hifas de *Pythium insidiosum* coradas com azul de lactofenol. Observam-se hifas cilíndricas, bem ramificadas e pouco septadas (aumento de 400X). Em (B) observa-se colônia de *P. insidiosum* em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. Observa-se crescimento plano de coloração amarelada.29
- Figura 2 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose equina. (A) Lesão extensa, ulcerada, granulomatosa e sanguinolenta. (B) *Kunkers* infiltrados em tecido. (C) *Kunker* isolado. Imagens cedidas pelo Prof. Dr. José Diomedes Barbosa da Universidade Federal do Pará.....32
- Figura 3 - (A) Estrutura monomérica do Photogem[®]. (B) Espectros de absorção e fluorescência de solução aquosa de Photogem[®] (1,5 µg/mL) com excitação em 405 nm, normalizados.40
- Figura 4 - (A) Estrutura molecular do Photodithazine[®]. (B) Espectros de absorção (em preto) e fluorescência (em vermelho) de solução aquosa de Photodithazine[®] (1,5 µg/mL) com excitação em 405 nm, normalizados...41
- Figura 5 - (A) Estrutura molecular da clorina e6. (B) Espectros de absorção (em preto) e fluorescência (em vermelho) de solução de clorina e6 solúvel em DMSO (1,5 µg/mL) com excitação em 405 nm, normalizados.42
- Figura 6 - (A) Estrutura molecular do azul de metileno. (B) Espectro de absorção de solução aquosa de azul de metileno (1,5 µg/mL), normalizado.....43
- Figura 7 - Equipamentos de LEDs emitindo em 530nm (A) e emitindo em 660nm (B), desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – IFSC/USP.49
- Figura 8 - Representação da utilização do Software ImageJ[®] para obtenção das medidas de área das colônias de *Pythium insidiosum*.53
- Figura 9 - Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* do grupo controle (A) com as que receberam tratamento com 70 J/cm² e Photodithazine[®] na concentração de 1,0 mg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente.56
- Figura 10 - Taxas de inibição de crescimento obtidas para os fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à TFD utilizando Photogem[®] como agente fotossensibilizador. Os parâmetros identificados com * referem-se aos grupos que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle e os identificados com + representam os grupos que apresentaram diferença estatística significativa (p≤0,05) em relação ao grupo tratado com Anfotericina B (100 µg/mL).57

- Figura 11 - Taxas de inibição obtidas para os fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à Terapia Fotodinâmica utilizando clorina como agente fotossensibilizador. Os parâmetros identificados com * referem-se aos grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle e os identificados com + representam os grupos que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado com Anfotericina B (100 $\mu\text{g/mL}$). 59
- Figura 12 - Taxas de inibição obtidas para os fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à Terapia Fotodinâmica utilizando azul de metileno como agente fotossensibilizador. Não houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos e, apesar de apresentar uma pequena inibição nas primeiras 48h, o crescimento foi normalizado no final dos sete dias de avaliação. 61
- Figura 13 – Taxas de inibição de crescimento de *P. insidiosum* para os melhores protocolos avaliados. 62
- Figura 14 - Microscopia eletrônica da varredura de fragmento de *P. insidiosum* do grupo controle. Destaque para a geometria cilíndrica das hifas e da integridade da parede celular..... 63
- Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photogem[®] (30 J/cm^2 e 25 mg/mL), mas que não foi inativado. Destaque para diferenciação da geometria cilíndrica da hifa além da presença de material amorfo em alguns pontos, o que sugere o rompimento da parede celular de algumas hifas (indicados com as setas)..... 64
- Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photogem[®] (70 J/cm^2 e 10 mg/mL) em que ocorreu a inativação do patógeno. Destaque para a perda da conformação cilíndrica, o enrugamento das paredes sugere uma modificação na quantidade de material intracelular e alteração da porção estrutural. Também pode ser observado o extravasamento de material amorfo sugerindo rompimento da parede celular das hifas..... 65
- Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photodithazine[®] (30 J/cm^2 e 1,0 mg/mL) em que não ocorreu a inativação do patógeno. O plano mais próximo (acima da linha tracejada) refere-se à região submetida à técnica e o plano mais distante (abaixo da linha tracejada) as hifas-filhas crescidas após o tratamento. Nota-se diferenciação de morfologia em ambas as regiões, com destaque para aparência achatada da região tratada. 66
- Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photodithazine[®] (30 J/cm^2 e 1,0 mg/mL) em que não ocorreu a inativação do patógeno. A imagem refere-se às hifas-filhas. Destaque para a perda da conformação

cilíndrica possivelmente devida alguma alteração fisiológica ocasionada pela Terapia Fotodinâmica.....67

Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photodithazine® (70J/cm² e 0,7 mg/mL) em que ocorreu a inativação do patógeno. Destaque para a perda da conformação cilíndrica, com o achatamento das hifas e desestruturação do biofilme, assim como extravasamento de material amorfo. Nesse caso, a resposta de destruição das hifas foi evidente em toda a amostra.....68

Figura 20 - Fluorescência natural de *P. insidiosum* na região do azul-verde (A). *P. insidiosum* marcado com safranina. Observa-se fluorescência na região verde-amarelo da parede celular e estrutura intracelular correspondente à celulose. (C) Núcleos de hifas de *P. insidiosum* marcados com acriflavina. A escala refere-se a 20 µm e aumento de 400X.....69

Figura 21 - Imagem de microscopia confocal de *P. insidiosum* imerso por 10, 30, 60, 360, 720, e 1440 minutos, respectivamente, em solução de Photodithazine® na concentração de 150 µg/mL e em seguida lavado por cinco vezes com agitação em vortex. A fluorescência em azul-verde representa a fluorescência natural do patógeno, e em vermelho a fluorescência do Photodithazine®. Destaque para a presença do composto no interior da hifa, independente do tempo de incubação, devido a uma provável afinidade da droga pelo patógeno. Quanto maior o tempo de incubação, maior a distribuição do composto no interior da hifa. A imagem foi obtida com aumento de 400X e a escala refere-se à 20 µm.....70

Figura 22 - Imagem de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* 24 horas após imersão em solução de Photodithazine® por 10, 30 e 60 minutos, respectivamente. Fluorescência em azul-verde relativa ao patógeno e em vermelho relativa ao Photodithazine®. Detalhe para o transporte do composto das hifas velhas para as hifas novas, sugerindo afinidade entre a droga e o patógeno. A imagem foi obtida com aumento de 400X e a escala refere-se à 20 µm.....71

Figura 23 - Imagens de microscopia confocal de fragmento de *P. insidiosum* imerso em solução de Photogem® por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. A fluorescência em azul-verde evidencia a fluorescência natural do patógeno e em vermelho do Photogem®. É possível observar a penetração do composto nas hifas do patógeno para tempos de incubação superiores a 1 hora. Além disso, para tempos maiores de 6 horas, a droga também se localizou em região de parede e membranas celular. Apesar de se distribuir pela hifa, isto não aconteceu de forma difusa e homogênea. A imagem foi obtida com aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.....73

- Figura 24 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *Pythium insidiosum* imersos em solução de azul de metileno na concentração de 150 µg/mL por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. Fluorescência em azul-verde do patógeno e em vermelho do composto. Destaque para a presença do composto no interior das células para todos os tempos de incubação avaliados. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm..... 74
- Figura 25 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* imersos por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. Fluorescência azul-verde relativa à fluorescência natural do patógeno e fluorescência na região do vermelho relativa à clorina e6. Nos primeiros 10 minutos já é observado o composto ligado a estruturas intracelulares específicas. À medida que aumenta o tempo de incubação, o composto distribui-se por toda a hifa, atingindo parede e membranas celular para tempos maiores de 1 hora. A escala refere-se à 20 µm. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm..... 75
- Figura 26 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* imersos em solução contendo Photodithazine® e Photogem® na proporção 1:1 por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. Nos primeiros tempos de incubação verifica-se fluorescência no interior da hifa, provavelmente referente ao Photodithazine® e na região de parede e membranas celular, provavelmente referente ao Photogem®. O aumento do tempo de incubação melhorou a distribuição da solução nas hifas, seja na região de parede ou na região intracelular. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm. 77
- Figura 27 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* imersos em solução contendo azul de metileno e Photodithazine® na proporção 1:1 por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. Observa-se presença dos compostos em estruturas intracelulares do patógeno para todos os tempos de incubação. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm..... 78
- Figura 28 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* antes (A) e imediatamente após tratamento com TFD após imersão por 30 (B), 60 (C), 360 (D), 720 (E) e 1140 minutos (F) em solução de Photodithazine® na concentração de 1,0 mg/mL. Em (A) observa-se hifa cilíndrica, ramificada, pouco septada, e com parede celular bem definida. (B) Observa-se parede e membranas celulares bem definidas com regiões de ausência de fluorescência relativas às estruturas intracelulares. Em (C, D, E e F) nota-se ruptura de parede celular com extravasamento e deposição de material amorfo. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm. 80

- Figura 29 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* antes e após tratamento com TFD após imersão em solução de Photogem[®] na concentração de 10 mg/mL. (A) Fragmento controle com hifas cilíndricas e bem definidas. Em (B, C, D, E e F) observam-se regiões de ausência de fluorescência relativas às hifas inativadas, envoltas por regiões de hifas bem delimitadas. Isto comprova a distribuição heterogênea do Photogem[®] entre as hifas. Este fato é mais evidente para tempos de incubação superiores a 6h (E e F), quando o composto localiza-se nas regiões intracelular e parede e membranas celulares. Além disso, nos quadros de B-D observa-se Photogem[®] não degradado durante a TFD. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se à 20 µm.82
- Figura 30 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à TFD após imersão em solução de clorina e6 na concentração de 1,0 mg/mL. Em (A) observa-se paredes celular íntegras com regiões intracelulares de ausência de fluorescência, possivelmente relativas às estruturas intracelulares que foram oxidadas com a TFD. Em (B, C, D e E) observa-se rompimento de parede celular, extravasamento e deposição de material amorfo, possivelmente devido a localização do composto nas regiões de parede e membranas celulares. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.....83
- Figura 31 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à TFD após imersão em solução de azul de metileno na concentração de 1,0 mg/mL por 30 (B), 60 (C), 360 (D), 720 (E) e 1440 minutos (F). A TFD não causou efeito na morfologia das hifas, nem alterou o crescimento do patógeno. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.84
- Figura 32 - (A) Blocos de DAS a 2% contendo hifas de *P. insidiosum* cultivados em Agar-água para obtenção do parasitismo em gramínea. (B) Parasitismo em gramínea e formação de esporângios de *P. insidiosum* em meio líquido de indução. (C) Destaque para esporângio e maturação de zoósporos de *P. insidiosum*. (D) Liberação de zoósporos de *P. insidiosum* em meio de indução.....95
- Figura 33 - (A) Administração intravenosa do fotossensibilizador com auxílio de cateter. (B) Animal mantido em anestesia inalatória. (C) Irradiação da lesão experimental de pitiose.97
- Figura 34 - Aspecto macroscópico externo da lesão bem delimitada e com apalpação firme (A). Aspecto interno da lesão induzida na região das costas (B).99
- Figura 35 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose experimental após 15 dias de indução na região tibial em membro anterior (A) e aspecto macroscópico da superfície de corte da lesão (B) As áreas

amareladas no interior da lesão mostra a presença do micro-organismo. 100

Figura 36 - Espectro de emissão de fluorescência da lesão experimental de pitiose antes (em vermelho) e depois (em preto) da realização da TFD, utilizando Photogem[®]. A banda na região azul-verde (450-550) refere-se à fluorescência do tecido e o pico em aproximadamente 630 nm, à presença de Photogem[®] na lesão..... 101

Figura 37 - Espectro de fluorescência da lesão experimental de pitiose antes (em preto) e depois (em vermelho) da realização da TFD, utilizando Photodithazine[®] como agente fotossensibilizante. A banda na região do azul-verde (450-550) refere-se à fluorescência do tecido e o pico em aproximadamente 660nm à presença do Photodithazine[®] na lesão. Nota-se completa degradação do composto após a terapia fotodinâmica..... 101

Figura 38 - (A) Aspectos macroscópicos da lesão experimental de pitiose antes da realização da TFD. (B) Imagem imediatamente após a aplicação da TFD com Photodithazine[®]. (C) Imagem 48h após a TFD. Destaque para a presença de ulceração e redução da lesão. (D) Imagem 10 dias após o tratamento com TFD. Destaque para regressão total da lesão.. 103

Figura 39 - Cortes histológicos do grupo controle. (A) Coloração HE revela infiltrado inflamatório severo com presença de fibrogranuloma envolto por células-T e fibrose. (B) Coloração de Grocott mostra hifas coradas em marrom envoltas por processo inflamatório, como esperado para pitiose (100X)..... 104

Figura 40 - Biópsia do grupo tratado com terapia fotodinâmica. (A) Coloração HE revela arranjo regular das células da epiderme e presença de infiltrado inflamatório na interface derme-epiderme, característico do efeito da TFD na região. (B) Coloração de Grocott mostra arranjo normal das fibras de colágeno e ausência de hifas (100X). 105

Figura 41 - Cortes histológicos do grupo controle. (A) Coloração HE revela infiltrado inflamatório severo com presença de fibrogranuloma envolto por células-T e fibrose. (B) Coloração de Grocott mostra hifas coradas em marrom envoltas por processo inflamatório (100X). 106

Figura 42 - Biópsia do grupo tratado com terapia fotodinâmica. (A) Coloração HE revela arranjo regular das células da epiderme e das fibras de colágeno. (B) Coloração de Grocott mostra fibras de colágeno coradas em preto e ausência de hifas. 106

Figura 43 - Quantificação da extração de DNA, PCR e Nested-PCR para detecção de *P. insidiosum* em lesão experimental em coelhos. 1- Low Mass Ladder (Invitrogen – 4ul); 2 – extração de DNA lesão coelho 9; 3 – extração de DNA lesão coelho 9; 4 – 100 bp Ladder (Promega – 8ul); 5 – PCR ITS1/ITS2P (outer primers); 6 – PCR ITS1/ITS2p (outer

primers); 7 Controle positivo (DNA Eq-1); 8 – No; 9 – 50 bp Ladder (Fermentas – 5 ul); 10 – Nested-PCR amostra 5 PI1/PI2 (inner primers); 11 – Nested-PCR amostra 6 – PI1/PI2 (inner primers); 12 – Nested-PCR amostra 7 PI1/PI2 (inner primers); 13 – No-Nested..... 107

- Figura 44 - Lesão suspeita de pitiose equina antes do tratamento com TFD (A e B). Aplicação dos fotossensibilizadores intralesional e aplicação tópica de creme de azul de metileno a 20% (C e D). Irradiação de toda a área afetada, com ênfase das bordas. Utilizou-se fibra óptica homogênea acoplada a laser emitindo em 660nm (E e F). Aspecto da lesão após a TFD. Detalhe para o aspecto seco e escurecido após o tratamento (G-J). 115
- Figura 45 - Pônei com pitiose na região do jarrete em membro posterior esquerdo com presença de kunkers e exsudação característica de pitiose (A e B). (C) Injeção intralesional de fotossensibilizador. (D). Irradiação da lesão. 117
- Figura 46 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose equina, parcialmente ulcerada, na região abdominal ventral evidenciando intensa exsudação (A-B). Aplicação intralesional do fotossensibilizador (C). 118
- Figura 47 - (A) Irradiação intralesional com fibra difusora de 2 cm. (B) Aspecto macroscópico da lesão após a primeira sessão de Terapia Fotodinâmica. (C) Detalhe do aspecto da lesão após o tratamento com alteração de textura e coloração além de drenagem. (D) Irradiação intralesional durante a segunda sessão de Terapia fotodinâmica. (E) Aspecto da lesão após a segunda sessão de TFD. Destaque para a drenagem de secreção sanguinolenta com *kunkers*. (F) Aspecto macroscópico da lesão no final do tratamento. 119
- Figura 48 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose equina 24h após debridamento cirúrgico. Lesão com bordas definidas, com fundo sujo, tecido necrótico, regiões amareladas com presença de *kunkers* e secreção sanguinolenta e abundante. 120
- Figura 49 - Administração intralesional de solução de clorina e6 (A) e irradiação com fibra óptica acoplada a laser emitindo em 660nm (B). 121
- Figura 50 - Lesão antes da TFD com exsudação característica de pitiose equina (A) e após a TFD com aparência seca (B). 121
- Figura 51 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose equina cinco dias após a realização de uma sessão de TFD. Lesão com bordas definidas, com tecido de granulação, sem evidências de tecido necrótico nem regiões com *kunkers* 122
- Figura 52 - Aspecto macroscópico da lesão 15 dias após a realização da TFD. Lesão em processo de cicatrização na região central e posterior (D), e

bordas com presença de *kunkers*, indicando recidiva da lesão (A, B, C). 123

Figura 53 - Aspecto imediatamente após a segunda sessão de TFD. Lesão em processo de cicatrização nas regiões central e posterior, desprendimento de *kunkers* das bordas e aparência necrótica. 124

Figura 54 - Aspecto da lesão cinco dias após a Terapia Fotodinâmica. Lesão em processo de cicatrização das regiões centrais e de bordas (re-epitelização), ausência de *kunkers* e necrose. 125

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TERAPIA FOTODINÂMICA E PITIOSE	25
1-1. INTRODUÇÃO	27
1-2. <i>Pythium insidiosum</i>	28
1-2.1 PITIOSE	31
1-2.2 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DA PITIOSE	32
1-2.3 PITIOSE EXPERIMENTAL	34
1-3 TERAPIA FOTODINÂMICA	35
1-3.1 TERAPIA FOTODINÂMICA EM MICRO-ORGANISMOS.....	36
1-3.2 FOTOSSENSIBILIZADORES.....	39
1-4. OBJETIVOS	44
1-4.1 GERAL	44
1-4.2 ESPECÍFICOS	44
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Pythium insidiosum</i>	45
2-1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
2-2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2-2.1 ISOLADO	47
2-2.2 PADRONIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE <i>Pythium insidiosum</i>	48
2-2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES	48
2-2.4 FONTE LUMINOSA.....	48
2-2.5 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ANFOTERICINA B SOBRE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i> DO ISOLADO DE <i>Pythium insidiosum</i>	49
2-2.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE NO ESCURO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES SOBRE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Pythium insidiosum</i>	50
2-2.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO LUMINOSO SOBRE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Pythium insidiosum</i>	50
2-2.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Pythium insidiosum</i>	50
2-2.9 CÁLCULO DA TAXA DE INIBIÇÃO.....	52
2-2.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	53
2-2.11 CINÉTICA EM MICROSCÓPIO CONFOCAL	54
2-2.12 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MICROSCOPIA CONFOCAL	54
2-3 RESULTADOS	55
2-3.1 TAXA DE INIBIÇÃO	56
2-3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	62

2-3.3 CINÉTICA EM MICROSCOPIA CONFOCAL.....	69
2-3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MICROSCOPIA CONFOCAL.....	80
2-4 DISCUSSÃO	85
CAPÍTULO 3 – TERAPIA FOTODINÂMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE PITIOSE.....	91
3-1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	93
3-2. MATERIAL E MÉTODOS	94
3-2.1 INDUÇÃO DE ZOOSPORANGÊNESE	94
3-2.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	95
3-2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES	96
3-2.4 FONTE LUMINOSA	96
3-2.5 TERAPIA FOTODINÂMICA.....	96
3-2.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	97
3-2.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	97
3-2.8 NESTED-PCR	98
3-3. RESULTADOS	98
3-3.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	98
3-3.2 ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA	100
3-3.3 ANÁLISE DAS LESÕES.....	102
3-3.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	104
3-3.5 NESTED-PCR	107
CAPÍTULO 4 – TRATAMENTO DE EQUINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Pythium insidiosum</i>	111
4-1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	113
4-2 CASO 1	114
4-3 CASO 2.....	116
4-4 CASO 3.....	118
4-5 CASO 4.....	120
4-6 DISCUSSÃO	126
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
5-1 CONCLUSÕES	134
REFERÊNCIAS.....	135
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal para os estudos de infecção experimental de pitiose.....	145
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal para o tratamento de pitiose equina.	146

**CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE
TERAPIA FOTODINÂMICA E PITIOSE**

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TERAPIA FOTODINÂMICA E PITIOSE

1-1 INTRODUÇÃO

A pitiose é uma infecção de natureza granulomatosa que ocorre principalmente nos tecidos cutâneo-subcutâneo, causada pelo oomiceto *Phythium insidiosum*. Acomete principalmente animais que vivem em áreas alagadas, destacando-se os equinos, entretanto já foram reportados vários casos em bovinos, caninos, ovinos, felinos, animais silvestres e ave. Em humanos, a grande maioria de casos tem sido observada em trabalhadores rurais de plantações de arroz na Tailândia (1-8). No Brasil existem cerca de 100 casos de pitiose publicados, incluindo caninos, equinos, bovinos e humanos, mas estima-se que este número seja muito maior, uma vez que muitos casos não são notificados (4, 9-21). Em 2001, Santurio e colaboradores estimaram que entre 2 e 5% de um rebanho de aproximadamente 140.000 animais contraem pitiose por ano no Pantanal (22). Dez anos mais tarde, Santos e colaboradores realizaram um estudo epidemiológico no Pantanal matogrossense e relataram que a incidência média anual de pitiose é de 0,22% para bovinos e 12,5% para equinos. Além disso, os índices de mortalidade e letalidade médios, para equinos, são de 5,88 e 45,45% (15).

Apesar de atualmente não representar um problema de saúde pública, em termos de incidência, a importância da sua investigação é a inexistência de um tratamento eficiente. O *P. insidiosum* apresenta um ciclo de vida semelhante a dos fungos e a forma infectante do micro-organismo é a de zoósporo, formado na água. A contaminação ocorre através do contato do zoósporo com a pele do hospedeiro, usualmente em uma área de descontinuidade do epitélio, e a progressão da infecção resulta na ulceração cutânea com intenso processo inflamatório (23). Esse micro-organismo não responde aos antifúngicos convencionais, por não apresentar ergosterol na membrana celular, molécula alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas disponíveis. O tratamento realizado é a ressecção cirúrgica do tecido infectado, no entanto, a recidiva é frequente, mesmo com extensa margem de

remoção, uma vez que a identificação das hifas invadindo o tecido não é simples a olho nu. Como resultado, o dano tecidual vai se tornando cada vez mais extenso e profundo, podendo atingir camadas musculares até o osso. Em cavalos é frequente a eutanásia do animal, pelo insucesso no controle da infecção, pela contraindicação da amputação do membro e pelo quadro de anemia severa.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada para o tratamento de diversos tipos de doenças como tumores gastrointestinais, cerebrais, de bexiga, de colo de útero, de próstata, de esôfago, de pele não-melanoma, de boca, queratose actínica, sarcoma de Kaposi, entre outros (24). Apesar de a técnica estar mais focada no tratamento de neoplasias desde 1975, a terapia fotodinâmica tem mostrado potencial para o tratamento de infecções. Estudos mostram a eficiência da técnica para a inativação de bactérias, assim como uma possível ferramenta para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos, fungos e infecções por parasitas (25-31). A terapia fotodinâmica vem sendo apresentada como uma eficiente técnica de controle microbiano em diversos tipos de infecções (32-34) e pode constituir uma alternativa de tratamento para a pitiose.

1-2 *Pythium insidiosum*

O *Pythium insidiosum* é um micro-organismo semelhante a um fungo pertencente ao Reino *Stramenophila*, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Peronosporales, família *Pythaceae*, gênero *Pythium*, espécie *Pythium insidiosum* (35). O patógeno possui hifas cilíndricas e largas, pouco septadas. Em cultura, as hifas têm aparência amarelada e possui crescimento plano.

Figura 1 - (A) Hifas de *Pythium insidiosum* coradas com azul de lactofenol. Observam-se hifas cilíndricas, bem ramificadas e pouco septadas (aumento de 400X). Em (B) observa-se colônia de *P. insidiosum* em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. Observa-se crescimento plano de coloração amarelada.

Os fatores que diferenciam os oomicetos dos fungos verdadeiros incluem mitocôndrias de crista tubular, e corpos de Golgi consistindo de múltiplas cisternas achatadas. Além disso, os oomicetos apresentam uma organela particular denominada vacúolos de corpo denso. Essas estruturas contêm material elétron-denso que apresenta um arranjo paracristalino e lamelar, semelhante à impressão digital (35). Eventualmente, este material condensa no interior do vacúolo para formar glóbulos elétron-denso esférico. Powell e Bracker estudaram as organelas do oomiceto *Phytophthora palmivora* e sugeriram que há nestes vacúolos grande quantidade de polissacarídeos (36). Outra característica importante dos oomicetos está relacionada à composição da parede celular, que é composta, principalmente, por β -1,3- e β -1,6-glucanas e celulose. Fungos verdadeiros, diferentemente, têm essa estrutura composta por quitina. O aminoácido hidroxiprolina também já foi descrito na parede de oomicetos. As hifas de oomicetos não apresentam septos regularmente espaçados, e por isso cada compartimento é composto por inúmeros núcleos, sem um número específico em cada compartimento. Núcleo e outras organelas se apresentam algumas vezes na periferia da hifa como um grande vacúolo central distante do ápice da hifa (35).

Garcia e colaboradores analisaram as características de ultraestruturas do *P. insidiosum* e, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, verificaram a presença de parede celular e membrana celular associada ao plasmalema (37). A membrana celular e o plasmalema apresentam-se entrelaçados para formar uma espessa camada interior. As vesículas citoplasmáticas aparentaram ser transportadas a partir do compartimento citosólico para a plasmalema e depois

integrada na membrana plasmática. No compartimento citosólico, foram observados grandes vacúolos contendo corpos negros elétron-denso, parecidos com os descritos por Alexopoulos (35, 37). O núcleo apresenta-se envolto por bicamada lipídica e com cromatina granular. Foram observados também vesículas de Golgi e microtúbulos dispersos por toda a hifa além de diversas mitocôndrias com crista tubular foram observadas.

Algumas características bioquímicas também separam oomicetos de fungos verdadeiros como a síntese do aminoácido lisina e o metabolismo de esterol. Enquanto os fungos verdadeiros sintetizam lisina através da via do ácido alfa aminoadípico, os oomicetos sintetizam pela via do ácido diaminopimélico, como as plantas. Em vez de estocar glicogênio com fungos verdadeiros, os oomicetos possuem β -1,3-glucanas, denominadas micolaminarinas, as quais estão relacionadas ao estoque de glucanas e polissacarídeos, comuns em algas. Outra importante característica que difere oomicetos de fungos verdadeiros é a ausência de ergosterol na membrana plasmática, fato este que torna difícil a resposta do patógeno frente às drogas antifúngicas, uma vez que a inibição da síntese de ergosterol consistiu um dos principais mecanismos de ação destas drogas (35).

O ciclo de vida do *P. insidiosum* baseia-se na colonização de vegetais em áreas alagadas, os quais servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do micro-organismo. As hifas colonizam o tecido vegetal e se desenvolvem. Na porção apical das hifas observa-se o processo de zoosporangênese com a formação dos zoosporângios, os quais correspondem a dilatações globosas cujo conteúdo citoplasmático sofre sucessivas clivagens até dar origem aos zoósporos biflagelados, que são a forma infectante do patógeno. Quando liberados, os zoósporos se movimentam na água até encistarem-se em tecido vegetal. Ao penetrar no tecido, os zoósporos perdem seus flagelos e dá-se início a formação de um tubo germinativo, originando um novo micélio. Os animais provavelmente se infectam ao entrar em contato com os zoósporos no ambiente aquático (23).

Mendoza e Prendas descreveram o processo de indução de zoosporangênese de *P. insidiosum* a partir da cultura de isolados do patógeno em meio Agar-água 2% por 24 horas a 35°C e posterior parasitismo em gramíneas previamente autoclavadas. Após este período, essas gramíneas eram colocadas em Placas de Petri contendo meio líquido de indução composto por duas diferentes soluções. Solução A: K_2HPO_4 (1,0 M), KH_2PO_4 (1,0 M), $(NH_4)_2HPO_4$ (3,66 M), e

solução B: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M). O Meio de indução era obtido pela mistura de 0,5mL da solução A e 0,1mL da solução B em 1.000mL de água destilada estéril (38). Este protocolo é baseado no parasitismo de fragmentos de grama em meio de cultura com pouco nutriente disponível seguido de incubação em meio contendo íons com temperatura e pH adequados. Shipton descreveu que a liberação e motilidade dos zoósporos formados dependem diretamente da quantidade destes íons presentes no meio (39).

Pereira e colaboradores reportaram a dificuldade da obtenção de zoosporangênese em isolados mantidos em meio de cultura rico em nutrientes por longos períodos. Observou-se que estes isolados não apresentavam crescimento quando cultivados em Agar-água. Desenvolveu-se, então, um protocolo baseado em cultivo prévio em *Corn Meal Agar* e novo cultivo no mesmo meio de cultura com adição das gramíneas autoclavadas, com incubação por 5 dias a 37°C. Após este período, foi realizada a indução em meio descrito anteriormente. A quantidade de zoósporos produzidos variou de acordo com a idade do isolado, sendo que o número foi maior para isolados mais recentes (40).

1-2.1 PITIOSE

A pitiose é uma doença ainda pouco investigada, sendo os primeiros relatos de 1902 em cavalos e, em seguida, em cachorros, gatos e bovinos. A primeira infecção em humanos foi reportada na Tailândia em 1985 e, desde então, novos casos têm sido relatados, inclusive em áreas onde o agente era conhecido somente como patógeno animal, como Costa Rica, EUA, Nova Zelândia, Malásia, Austrália e Haiti (8). A pitiose apresenta alto índice de morbidade e mortalidade, chegando o último a 100% nos casos de acometimento vascular ou sistêmico. No Brasil, a doença em equinos se encontra amplamente distribuída pelo território nacional, tendo sido descrita no Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, São Paulo, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia (4, 19, 41-43). O Pantanal Matogrossense é considerado região endêmica e de maior ocorrência

mundial de pitiose equina. Embora a maioria dos casos de pitiose no Brasil refira-se a animais a doença foi recentemente diagnosticada em humanos (17, 44).

As lesões em equinos são ulcerativas granulosas, extensas e com rápida evolução. Têm aspecto tumoral e exsudação sanguinolenta. O *P. insidiosum* forma estruturas denominadas *kunkers*, massas branco-amareladas de aspecto arenoso e ramificadas, constituídas de hifas do patógeno e células necróticas (Figura 2). Essas estruturas são específicas da pitiose equina, não sendo observada em nenhuma outra espécie (45).

Figura 2 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose equina. (A) Lesão extensa, ulcerada, granulomatosa e sanguinolenta. (B) *Kunkers* infiltrados em tecido. (C) *Kunker* isolado. Imagens cedidas pelo Prof. Dr. José Diomedes Barbosa da Universidade Federal do Pará.

1-2.2 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DA PITIOSE

O tratamento convencional da pitiose é a remoção cirúrgica, com excisão de toda a área afetada, respeitando-se uma margem de segurança para evitar recidivas. Esse tipo de tratamento se torna impraticável, em alguns casos, devido às estruturas anatômicas envolvidas na área da lesão, sendo indicado, com bons resultados, somente em casos de lesões pequenas e superficiais (46-47). O debridamento

cirúrgico de lesões cutâneas de caninos e equinos ainda é um procedimento de escolha, entretanto a taxa de recidiva é de aproximadamente 45% (48). Cirurgias radicais, incluindo amputação, ainda é o procedimento mais adotado para humanos e alguns animais (8, 45, 49).

A imunoterapia, proposta por Miller (47), é uma alternativa para o tratamento da pitiose. Esse tipo de tratamento vem sendo amplamente utilizado em equinos, porém com resultados variados. Fatores individuais, como anergia (ausência de resposta) em casos crônicos e ausência de estimulação em casos agudos, podem explicar o variável índice de eficiência da imunoterapia (50). Em alguns animais imunocomprometidos, as lesões e o quadro clínico evoluem para o óbito, em função da incapacidade de produzir anticorpos (47). Em 1992, Mendoza e colaboradores avaliaram uma nova vacina em 18 equinos e 6 caninos, associada a cirurgia e drogas antifúngicas. Dos equinos, 13 responderam à terapia e foram curados. Cinco deles não apresentaram resposta e foram a óbito. As lesões variaram de 60X40 mm a 300X300 mm, com duração entre 15 dias e mais de 2 meses. O tamanho da lesão e sua duração não apresentaram relação significativa com a cura dos animais. Nos cães, um deles apresentou a doença gastrointestinal e não respondeu ao tratamento. Dos outros cinco animais, apenas dois foram curados. As lesões variaram de 30X20 mm a 100x50mm e também não houve relação entre o tamanho das lesões e a resposta obtida com o tratamento (51). Dykstra e colaboradores relataram o tratamento de 15 casos de pitiose cutânea-subcutânea em cães com imunoterapia ou drogas antifúngicas como anfotericina B, nistadin lipossomal, itraconazol e cetoconazol, sem sucesso (52).

No tratamento químico, as drogas mais utilizadas até o momento foram anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol, além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e de sódio. McMullan e colaboradores obtiveram 50% de eficiência associando remoção cirúrgica e anfotericina B; 30% de eficiência apenas com anfotericina B e 20% dos casos de ficomicoses¹ subcutâneas não responderam ao tratamento. A resposta das diferentes formas de tratamento é variável, sendo, em muitos casos, influenciados pelo tamanho e duração da lesão, idade e estado nutricional do animal (49). O sucesso no tratamento de pitiose equina com uso de iodeto de potássio, após excisão cirúrgica, já foi relatado por alguns

¹ Doenças causadas por fungos, nas quais a pitiose estava inclusa.

autores (53-55). Em contrapartida, Meireles e colaboradores não obtiveram sucesso ao tratar dois equinos com o uso dessa substância (20).

Estudos *in vitro* revelam resultados contraditórios aos obtidos na terapêutica clínica. Anfotericina B e hamicina não apresentaram atividade satisfatória, enquanto que os azólicos inibiram o crescimento *in vitro* dos isolados de *Pythium insidiosum* (56). Contrariando esses resultados, Triscott e colaboradores relataram sucesso no tratamento de pitiose subcutânea periorbital em humano com anfotericina B (57).

Argenta e colaboradores investigaram a atividade *in vitro* e *in vivo* do itraconazol, voriconazol e terbinafina contra isolados de *P. insidiosum*. Os resultados indicam a eficiência da terbinafina nos isolados *in vitro*, entretanto no modelo experimental *in vivo* o tratamento não apresentou eficácia (58). A atividade da caspofungina também foi avaliada em isolados de *P. insidiosum in vitro*. Apesar disso, no modelo experimental *in vivo*, houve redução do tamanho das lesões, entretanto, houve recidiva assim que o tratamento foi interrompido (59).

1-2.3 PITIOSE EXPERIMENTAL

Miller e Campbell descreveram a susceptibilidade de coelhos à pitiose experimental com inoculação subcutânea de zoósporos de *Pythium insidiosum*. Os animais evidenciaram nódulos que evoluíram para fibrogranulomas eosinofílicos com características imunológicas similares à infecção natural (60). Apesar da semelhança imunológica, a infecção experimental não apresenta a ulceração característica da lesão natural. Dessa forma, trata-se de um modelo experimental para a avaliação de agentes antifúngico e pouco indicado para o tratamento localizado das lesões. Entretanto, além de ser o único modelo experimental disponível, ensaios *in vivo* são importantes para avaliar a distribuição dos compostos fotossensibilizantes em um modelo mais complexo do que o patógeno isolado. Adicionalmente, o modelo pode fornecer informações importantes relativas à fluência e intensidade luminosa.

1-3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que combina o uso de luz, oxigênio e compostos fotossensíveis para causar morte às células-alvo. A utilização da técnica teve início em Munique por Raab e von Tappeiner que observaram o efeito tóxico causado pelo laranja de acridina em células de paramécio na presença de luz. Em 1903 ocorreu a primeira aplicação clínica da técnica com a utilização de eosina e luz para o tratamento de lúpus vulgaris, sífilis, psoríases e câncer de pele superficial (61).

A fotodestruição dos tecidos pode ocorrer de duas maneiras diferentes: através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou do oxigênio singlete (mecanismo tipo II). No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas (preferencialmente O_2), produzindo radicais ou íons radicais (62). A maioria destes radicais reage instantaneamente com o O_2 , gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxila, os quais podem oxidar uma variedade de biomoléculas (62- 63).

No mecanismo tipo II, tipo principal da reação fotodinâmica com os fotossensibilizadores atuais, ocorre formação de oxigênio singlete, altamente reativo, através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio (63). O oxigênio singlete, quando gerado, pode reagir com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácido nucléicos. Como lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, as reações fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido alvo via necrose ou apoptose (62-63).

A Terapia Fotodinâmica pode ser aperfeiçoada visando melhorar a captação do fotossensibilizador pela célula-alvo, assim como direcionar a localização sub-celular destes compostos em alvos específicos. Além disso, fatores como fisiologia do tecido e propriedades fotofísicas devem ser levadas em consideração. A localização sub-celular dos fotossensibilizadores em sítios específicos é um importante fator para a eficácia da terapia fotodinâmica, uma vez que o oxigênio singlete possui meia-vida curta, e por isso o dano é causado na estrutura onde está

localizado ou bem próximo desta região. Para isso, estudos de cinética são necessários, pois permitem aumentar a eficiência da captação, distribuição e localização dos fotossensibilizadores em modelos *in vitro* e *in vivo*. Diferentes células-alvo, como tumorais ou de tipos distintos de micro-organismos, apresentarão maior ou menor susceptibilidade à reação fotodinâmica. Desta forma, os protocolos de tratamento, considerando o fotossensibilizador, o tempo de espera e os parâmetros de iluminação, devem ser customizados para cada aplicação da terapia fotodinâmica. Para o fotossensibilizador, os parâmetros importantes são: tipo de concentração, via de administração e tempo de incubação (intervalo entre administração e iluminação). Para a iluminação, o comprimento de onda, a irradiância, tipo intersticial ou superficial e a dose de energia entregue são os parâmetros a serem avaliados.

A absorção de substâncias exógenas por fungos é geralmente afetada negativamente pela lipofilicidade e positivamente pela hidrofobicidade e presença de grupos carregados. Os efeitos bioquímicos e funcionais da TFD incluem inativação de enzimas e outras proteínas e peroxidação lipídica, ocasionando lise da membrana celular, lisossomos e mitocôndria (64). Além disso, o oxigênio singleto gerado através da fotoexcitação do fotossensibilizador é um agente oxidante não-específico, e por isso a célula não possui um mecanismo de defesa contra esta molécula. Isto explica porque, teoricamente, não deve haver resistência inerente dos micro-organismos, mesmo daqueles resistentes às drogas antimicrobianas.

1-3.1 TERAPIA FOTODINÂMICA EM MICRO-ORGANISMOS

Infecções microbianas na pele e mucosas de humanos e animais são comuns em todo o mundo. O aumento no número de linhagens microbianas resistentes às drogas antimicrobianas impulsionou o desenvolvimento de novas técnicas para a inativação de micro-organismos. Estudos demonstram que em aproximadamente 2 anos após o início do uso disseminado de cada nova droga antimicrobiana existe o relato das primeiras linhagens resistentes. Isso decorre da seleção de espécies com mecanismos de resistência ao fármaco e o intervalo de

tempo para a observação clínica da infecção por essa população (65, 66). Essa situação ressalta ainda mais a importância do desenvolvimento de alternativas terapêuticas para controle microbiano à antibioticoterapia.

A terapia fotodinâmica vem se mostrando eficiente na inativação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como fungos e vírus. Uma das vantagens da técnica é a baixa probabilidade de seleção de micro-organismos resistentes, uma vez que a resistência às espécies reativas de oxigênio é praticamente impossível de ocorrer. Diversas biomoléculas são alvos da oxidação induzida, como lipídios, lisossomos, mitocôndria, proteínas de membranas, para induzir a morte celular (67).

Diversos fotossensibilizadores foram investigados para a terapia fotodinâmica antimicrobiana, entre eles, porfirinas, protoporfirina IX, ftalocianinas, clorinas e fenotiazínicos. Os fenotiazínicos, normalmente catiônicos, localizam-se principalmente na região de membrana plasmática de fungos induzindo morte por dano estrutural e variação na seletividade celular. Este composto apresentou eficiência na inativação de diversas espécies de *Cândida* como descrito por de Souza e colaboradores (68). Outras espécies microbianas foram inativadas pela TFD com azul de metileno e azul de toluidina como *Fonsecea pedrosoi*, *Claphialophora carrionii* (69), *Metharzium anisopiae*, *Aspergillus nidulans* (70). Outro estudo avaliou o efeito da TFD com azul de metileno em bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, observando baixa susceptibilidade destes micro-organismos à inativação por TFD com fenotiazínicos. De acordo com Zeina e colaboradores a maior susceptibilidade das células procarióticas é devido ao processo de inativação destas células ocorrer de maneira única, ou seja, todos os alvos da TFD presentes na célula são igualmente susceptível, assim danificar um deles já é suficiente para causar morte celular. Em células eucarióticas a inativação aparenta se um processo de muitas etapas, em que são necessários danos em mais um de um componente celular para ocorrer morte por TFD. Estes autores ainda salientam que a menor susceptibilidade de eucariontes pode ser justificada também pela presença de membrana nuclear, que pode atuar como barreira para o azul de metileno ou para os fotoprodutos da reação fotodinâmica (71).

As porfirinas apresentam um mecanismo de ação fotodinâmica diferente do apresentado pelos fenotiazínicos. Essas moléculas não são absorvidas pelas células fúngicas e o efeito fototóxico é causado devido à fotoativação das moléculas não

ligadas no meio aquoso (72-74). Quando irradiadas, as porfirinas alteram a membrana citoplasmática, permitindo sua penetração nas células e translocação para as membranas internas. Com a continuação da irradiação, iniciam-se danos nos alvos intracelulares. Em níveis bioquímicos, o fotoproceto envolve principalmente peroxidação lipídica, fotodegradação de esteróis insaturados e inativação de proteínas da parede celular (64).

Mang e colaboradores demonstraram que cepas de *Candida spp.* resistentes a fluconazol e Anfotericina B mostraram susceptibilidade equivalente a cepas não resistentes, quando tratadas com terapia fotodinâmica e porfirina (75). Demidova e Hamblin avaliaram o efeito de três fotossensibilizadores, rosa bengala, azul de toluidina e azul de metileno conjugado a poli-L-lisina em três classes de micro-organismos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A clorina mostrou ser o fotossensibilizador mais eficaz, seguida do azul de toluidina e rosa bengala, pouco efetivo (76). A clorina e6 também foi investigada na inativação de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella entérica*, com altas taxas de inibição principalmente para *S. aureus* e *P. aeruginosa* (77).

Micro-organismos, usualmente, formam estruturas tridimensionais denominadas biofilmes. Essas organizações estruturais geralmente não respondem bem à terapêutica com drogas antimicrobianas, desenvolvendo facilmente resistência a essas drogas, além de nesta conformação adquirem maior proteção inclusive perante o sistema imunológico do hospedeiro (78). Diversos estudos avaliaram o efeito da TFD em biofilmes *in vitro* e *in vivo*. Donnelly e colaboradores avaliaram a susceptibilidade de *Candida albicans*, nas formas planctônicas e de biofilme, utilizando a TFD com fenotiazínicos. A redução microbiana foi de 99% para a forma planctônica, utilizando concentração de 2 mg/mL de azul de toluidina e 100-200 J/cm² de fluência. Para redução microbiana similar na forma de biofilme, os autores utilizaram 5 mg/mL do composto, evidenciando a dificuldade, também para a TFD, de sua inativação (26). Dovigo e colaboradores também compararam o efeito da TFD em diversas espécies de *Cândida* nas formas planctônicas e em biofilmes, utilizando curcumina como agente fotossensibilizador. Nestes experimentos obtiveram redução de aproximadamente 98% para a forma planctônica e 85% para os biofilmes, confirmando os resultados encontrados por Donnelly et al. (79).

A TFD também foi avaliada para a inativação de biofilmes multi-espécies, incluindo *S. aureus*, *Streptococcus mutans* e *C. albicans* e encontraram resultados pouco satisfatórios quando comparados aos encontrados para biofilmes de única espécie microbiana (80).

Schneider e colaboradores realizaram ensaios para avaliar o dano causado pela TFD em biofilmes artificiais de *S. mutans* utilizando cloreto de fenotiazina. Através de microscopia confocal foi possível observar que o tratamento reduziu o número de células vivas de *S. mutans* apenas na camada superficial (10 mm), demonstrando a dificuldade de difusão dos compostos e penetração da luz (81).

O potencial da TFD na desinfecção de dentaduras também foi investigado. Ribeiro e colaboradores avaliaram o efeito da TFD em biofilmes de 60 dentaduras utilizando Photogem[®] como agente fotossensibilizador. Foram utilizadas duas concentrações diferentes do composto e duas formas de aplicação, em spray e em gel e fluência de 37,5 J/cm². No grupo que recebeu Photogem[®] na forma de spray, o número de dentaduras que não apresentaram crescimento microbiano após a TFD variou entre 53 e 60%. Já no grupo que utilizou o gel do composto esta variação foi entre 40 e 47% (82).

Para a TFD, bactérias são mais susceptíveis quando comparadas ao fungos. Este fato também é observado para os biofilmes de bactérias e fungos. Assim como os biofilmes apresentam maior resistência frente à TFD devido à dificuldade de difusão dos fotossensibilizadores e da penetração da luz na estrutura organizada, o *P. insidiosum* por também apresentar essa organização, torna-se mais resistente à técnica. Além disso, a celulose encontrada na parede celular, o alto metabolismo e a ausência de resposta perante as drogas antifúngicas, tornam este patógeno mais complexo que os biofilmes de bactérias e fungos.

1-3.2 FOTOSSENSIBILIZADORES

Para ser utilizado em TFD, um fotossensibilizador precisa apresentar características fotofísicas e fotoquímicas específicas, como seletividade pelas células-alvo, alta absorção na região entre 600 e 810 nm, alto rendimento quântico e

apresentar resposta biológica desejada. Devido à ausência de dados literários relacionados à inativação de *P. insidiosum* por TFD optou-se, neste trabalho, por investigar a ação das três principais classes de compostos utilizados para inativação microbiana para a verificação do melhor fotossensibilizador para esse micro-organismo.

1-3.2.1 Porfirinas

As porfirinas pertencem a uma classe distinta de compostos macrocíclicos vastamente encontrada na natureza possuindo importantes funções no metabolismo dos seres vivo e sítios ativos em diversos processos biológicos como na ligação e transporte de oxigênio, fotossíntese e transferência de elétrons (83). São muito utilizadas na Terapia Fotodinâmica como agente fotossensibilizador por possuir estabilidade química e fotoquímica e afinidade com estruturas biológicas. O espectro de absorção mostra a banda de Soret na região de aproximadamente 400 nm e quatro bandas Q entre 500 e 635nm como pode ser visualizado na Figura 3-B. O espectro de fluorescência, para excitação em 405 nm, apresenta banda em aproximadamente 614 nm e em 660 nm (Figura 3-B) (84).

Figura 3 - (A) Estrutura monomérica do Photogem®. (B) Espectros de absorção e fluorescência de solução aquosa de Photogem® (1,5 µg/mL) com excitação em 405 nm, normalizados.

1-3.2.2 Clorinas

As clorinas são porfirinas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região 640-700 nm. A clorina e₆ é uma forma derivada da oxidação da clorofila-a e apresenta importantes propriedades que a viabiliza como fotossensibilizador em potencial, como alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e coeficiente de extinção molar aproximado de 40000 M⁻¹cm⁻¹. (84).

As clorinas utilizadas neste trabalho são Photodithazine[®] (Photodithazine[®], Moscou – Rússia) e clorina e6 (sintetizada pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira/ Universidade Federal de São Carlos – UFSCar). Os dois compostos são sintetizados a partir da alga *Spirulina spp.*, entretanto o Photodithazine[®] tem a forma de sal de glucamina e solubilidade em água (Figura 4-A) e a clorina e6 forma de ácido e solubilidade em DMSO, sendo mais anfifílica (Figura 5-A).

O espectro de absorção do Photodithazine[®] apresenta banda de Soret com máxima absorção em 401 nm e três bandas Q, com máximos em 505, 600 e 655 nm. O espectro de emissão de fluorescência do Photodithazine[®] com excitação em 405 nm apresenta apenas uma banda de emissão com máximo de 660 nm como mostrado na Figura 4-B.

Figura 4 - (A) Estrutura molecular do Photodithazine[®]. (B) Espectros de absorção (em preto) e fluorescência (em vermelho) de solução aquosa de Photodithazine[®] (1,5 µg/mL) com excitação em 405 nm, normalizados.

O espectro de absorção da clorina e6 apresenta uma banda de absorção em 660 nm. O espectro de emissão de fluorescência com excitação em 405 nm apresenta uma banda com máxima emissão em 660nm mostrado na Figura 5.

Figura 5 - (A) Estrutura molecular da clorina e6. (B) Espectros de absorção (em preto) e fluorescência (em vermelho) de solução de clorina e6 solúvel em DMSO (1,5 µg/mL) com excitação em 405 nm, normalizados.

1-3.2.3 Azul de Metileno

O azul de metileno é um corante aromático heterocíclico com baixa toxicidade em humanos (Figura 6-A). Absorve na região de 656 nm (Figura 6-B) e mostra boa eficiência fotodinâmica principalmente na inativação de micro-organismos (84).

A

B

Figura 6 - (A) Estrutura molecular do azul de metileno. (B) Espectro de absorção (em preto) de solução aquosa de azul de metileno (1,5 µg/mL), normalizado.

A variedade das características fotofísicas e fotoquímicas dos fotossensibilizadores influencia diretamente na dinâmica de distribuição e localização celular destes compostos. Dessa forma, é fundamental investigar essas interações para cada micro-organismo de interesse, de modo a aumentar a seletividade e eficiência da TFD.

Considerando-se a importância da pitiose, o aumento do número de casos diagnosticados em animais e humanos e a problemática de sua terapêutica, se faz necessário o desenvolvimento de novas metodologias para a inativação do patógeno. A escolha pela terapia fotodinâmica foi baseada nos resultados promissores já apresentados para a infecção cutânea por bactérias e fungos (85-88). O estudo foi planejado para execução em três fases: (1) avaliação do efeito antimicrobiano *in vitro* e definição do melhor fotossensibilizador, (2) avaliação da resposta fotodinâmica em uma infecção induzida e (3) avaliação da resposta fotodinâmica em animais naturalmente infectados.

1-4. OBJETIVOS

1-4.1 GERAL

Avaliação da eficiência da terapia fotodinâmica no controle da pitiose cutânea e subcutânea.

1-4.2 ESPECÍFICOS

- Ensaios *in vitro* para a avaliação do dano celular fotodinâmico ocasionado no micro-organismo e comparação à droga antifúngica, anfotericina B;
- Cinética de três classes distintas de fotossensibilizadores;
- Ensaio *in vivo* em infecção subcutânea induzida em coelhos para a avaliação da resposta tecidual do hospedeiro e resposta sobre o micro-organismo;
- Avaliação da terapia fotodinâmica para o tratamento das lesões em cavalos naturalmente infectados por *P. insidiosum*.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO *in vitro* DE *Pythium insidiosum*

2-1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

In vitro:

- Avaliação do controle do crescimento em função dos parâmetros do protocolo: tipo, concentração, tempo de incubação do fotossensibilizador e dose de energia.
- Comparação com droga antifúngica (Anfotericina B)
- Cinética dos fotossensibilizadores em função do tempo de incubação (distribuição celular).

2-2 MATERIAL E MÉTODOS

2-2.1 ISOLADO

Foi utilizado isolado de *Pythium insidiosum* obtido de um caso de pitiose equina atendido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu. Kunkers obtidos da lesão do animal foram lavados em solução salina contendo 50 µg/mL de clorofenicol sucessivas vezes até que o líquido não mais se apresentasse turvo. A seguir, estes kunkers foram fragmentados em pequenos pedaços e cultivados em Placas de Petri contendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 4% (Difco®) a 35°C. O crescimento do patógeno foi observado após 24 horas, subcultivos sucessivos foram realizados visando obter o isolado sem contaminação. Além das características morfológicas, macro e microscópicas, obteve-se a identidade molecular deste isolado por técnicas específicas de biologia molecular,

como as reações de PCR e Nested-PCR, empregando-se primers específicos para *P.insidiosum*.

2-2.2 PADRONIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE *Pythium insidiosum*

Os experimentos foram realizados com o micro-organismo na forma de hifa. Esta metodologia difere da maioria dos trabalhos, que utilizam a contagem de unidades formadoras de colônia, devido a grande diferença morfológica e estrutural entre a forma de zoósporos (infectante) e de hifa (forma presente na lesão). Dessa forma, a inativação de zoósporos não forneceria parâmetros revelantes para a inativação do *Pythium insidiosum* utilizando a terapia fotodinâmica.

O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar (Difco® – BD & Co, EUA) com incubação a 37°C por 24h. Fragmentos padronizados de 5 mm de diâmetro foram retirados dos bordos da cultura para a realização dos ensaios.

2-2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

Foram avaliados três fotossensibilizadores pertencentes a três classes distintas, porfirina (Photogem® – Moscou, Rússia), clorina (Photodithazine® - Moscou, Rússia) e azul de metileno (Qhemis). A porfirina e a clorina utilizadas são medicamentos comerciais empregados para o tratamento de câncer com a terapia fotodinâmica.

2-2.4 FONTE LUMINOSA

Foram utilizados dois equipamentos com cinco diodos emissores de luz (*light emitting diodes* – LEDs) cada, para possibilitar a irradiação simultânea de cinco

amostras, desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico - LAT/USP (Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP). Os emissores de luz foram montados para a iluminação de uma área uniforme incluindo a cultura do *Pythium insidiosum* no centro. Para os ensaios com Photogem[®] foi utilizado equipamento com emissão em 530nm e para os realizados com Photodithazine[®] e azul de metileno foi utilizado equipamento com emissão em 660nm (Figura 7).

Figura 7 - Equipamentos de LEDs emitindo em 530nm (A) e emitindo em 660nm (B), desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – IFSC/USP.

2-2.5 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ANFOTERICINA B SOBRE O CRESCIMENTO *in vitro* DO ISOLADO DE *Pythium insidiosum*

Fragmentos padronizados do isolado de *P. insidiosum* foram semeados em placas de Petri contendo SDA. Foram utilizadas soluções de Anfotericina B nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL diluídas em solução salina estéril 0,85% a partir de solução estoque na concentração de 1mg/mL. Nos ensaios, adicionou-se 10 µL de Anfotericina B nas diversas concentrações de maneira a cobrir totalmente os fragmentos semeados e mantidos em estufa a 37°C. Esses fragmentos foram avaliados e fotografados nos períodos de 24h, 48h e 168h. Paralelamente foi realizado teste controle utilizando solução salina estéril 0,85%. Todos os experimentos foram realizados com cinco repetições.

2-2.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE NO ESCURO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES SOBRE O CRESCIMENTO *in vitro* DE *Pythium insidiosum*

Para avaliar o efeito dos fotossensibilizadores sobre o crescimento *in vitro* de *P. insidiosum*, 10 µL de cada composto foram adicionados, isoladamente, sobre fragmentos padronizados do patógeno. Após o procedimento, as placas foram mantidas em estufa a 37°C ao abrigo da luz. Simultaneamente, para o grupo controle (sem tratamento), foi realizado o mesmo procedimento adicionando solução salina (0.85%). Todos os experimentos foram realizados com cinco repetições e com as maiores concentrações das drogas avaliadas, sendo 25 mg/mL de Photogem[®], 1,3 mg/mL de Photodithazine[®] e 100 µg/mL de Azul de Metileno.

2-2.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO LUMINOSO SOBRE O CRESCIMENTO *in vitro* DE *Pythium insidiosum*

Fragmentos padronizados de 5 mm de diâmetro do isolado foram cultivados em placa de Petri contendo SDA e irradiados com intensidade de 65 mW/cm² e fluência de 70 J/cm², com comprimentos de onda de 530 ou 660nm. Paralelamente foi realizado teste controle em que o fragmento não foi exposto à luz. Todos os ensaios foram realizados com 5 repetições.

2-2.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO *in vitro* DE *Pythium insidiosum*

Fragmentos padronizados do patógeno foram semeados em placas de Petri contendo meio DAS e adicionou-se 10 µL de fotossensibilizador, cobrindo todo o fragmento. Após 20 minutos de incubação no escuro e à 37°C, iniciou-se a irradiação. Os resultados foram comparados com o controle, o qual consistiu da

incubação do patógeno em meio SDA. Os testes foram realizados com cinco repetições. Paralelamente foi realizado teste controle com adição de solução salina (0,85%) e sem exposição à luz.

Não existem relatos anteriores da inativação do *P. insidiosum* empregando a terapia fotodinâmica, por isso, foram realizados diversos testes para determinar as melhores concentrações e fluências para cada fotossensibilizador utilizado. Avaliou-se concentrações de Photogem[®] entre 100 µg/mL e 35 mg/mL, com fluências entre 10 J/cm² e 100 J/cm². Para o Photodithazine[®], concentrações entre 10 µg/mL e 5 mg/mL com fluências entre 10 J/cm² e 100 J/cm². Para o azul de metileno investigou-se concentrações entre 10 µg/mL e 500 µg/mL e fluências entre 10 J/cm² e 100 J/cm². Os parâmetros de concentração dos fotossensibilizadores e fluências mostrados neste trabalho representam os melhores resultados obtidos.

As concentrações de Photogem[®] avaliadas foram 10, 15 e 25 mg/mL, e para o Photodithazine[®] as concentrações foram de 0.7, 1.0 e 1.3 mg/mL e para o azul de metileno, 50, 75 e 100 µg/mL. As fluências avaliadas foram 30, 50 e 70 J/cm². Os protocolos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de terapia fotodinâmica avaliados na inativação *in vitro* do *P. insidiosum*.

Fotossensibilizador	Fluência	Concentração do fotossensibilizador	Intensidade	Tempo de exposição
Photogem [®]	30 J/cm ²	10 mg/mL	65 mW/cm ²	461 s
		15 mg/mL		
		25 mg/mL		
	50 J/cm ²	10 mg/mL		770 s
		15 mg/mL		
		25 mg/mL		
	70 J/cm ²	10 mg/mL		1076 s
		15 mg/mL		
		25 mg/mL		
Photodithazine [®]	30 J/cm ²	0.7 mg/mL	65 mW/cm ²	461 s
		1.0 mg/mL		
		1.3 mg/mL		
	50 J/cm ²	0.7 mg/mL		770 s
		1.0 mg/mL		
		1.3 mg/mL		
	70 J/cm ²	0.7 mg/mL		1076 s
		1.0 mg/mL		
		1.3 mg/mL		
Azul de Metileno	30 J/cm ²	50 µg/mL	65 mW/cm ²	461 s
		70 µg/mL		
		100 µg/mL		
	50 J/cm ²	50 µg/mL		770 s
		70 µg/mL		
		100 µg/mL		
	70 J/cm ²	50 µg/mL		1076 s
		70 µg/mL		
		100 µg/mL		

2-2.9 CÁLCULO DA TAXA DE INIBIÇÃO

Todos os fragmentos foram fotografados após 24, 48 e 168h após a realização dos ensaios. O crescimento foi determinado através de medidas da área de cada fragmento realizadas em software ImageJ[®] (Image processing and analysis

in JAVA, [HTTP://rsbweb.nih.gov/ij/](http://rsbweb.nih.gov/ij/)), como demonstrado na Figura 8. A partir destas medidas foram realizados cálculos da Taxa de Inibição de crescimento do *P. insidiosum* por meio de comparações entre os grupos tratados e o grupo controle (Eq.1).

$$TI = 1 - \left(\frac{T}{C} 100 \right), \quad \text{Eq.1}$$

Em que TI é a Taxa de Inibição em porcentagem, T é a área de crescimento medida do fragmento tratado e C é a área de crescimento medida do fragmento controle. A análise estatística foi realizada comparando-se áreas de crescimento entre os diferentes tratamentos através do teste de Kruskal-Wallis. O teste de Dunn foi utilizado para as comparações múltiplas, com o objetivo de detectar os tratamentos que diferem do grupo controle e do grupo tratado com Anfotericina B.

Figura 8 - Representação da utilização do Software ImageJ^o para obtenção das medidas de área das colônias de *Pythium insidiosum*.

2-2.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os fragmentos submetidos aos testes anteriores foram avaliados através da microscopia eletrônica de varredura a fim de se obter informações sobre a ação da

terapia fotodinâmica na morfologia das hifas do patógeno. Este ensaio foi realizado junto ao Serviço de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, utilizando o Microscópio de Varredura Ambiental (FEI Company- Quanta 200).

2-2.11 CINÉTICA EM MICROSCÓPIO CONFOCAL

Fragmentos de *P. insidiosum* foram cultivados em caldo Sabouraud Dextrose (Difco® – BD & Co, EUA) por 24h em estufa a 37°C. Para preparo de amostra para microscopia confocal, os fragmentos foram lavados em água destilada autoclavada por cinco vezes com agitação em vortex de modo a eliminar o caldo sabouraud, uma vez que este meio de cultura apresenta fluorescência e poderia influenciar nos resultados obtidos. O patógeno foi incubado em solução contendo os fotossensibilizadores isolados, por diferentes períodos, 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos. Os fragmentos foram retirados e lavados por cinco vezes com agitação em vortex e analisados em microscópio. Foram avaliados quatro compostos, Photogem®, Photodithazine®, azul de metileno e clorina e6, na concentração de 150 µg/mL.

As imagens foram realizadas em microscópio confocal invertido (Zeiss – LSM780) com excitação em 405 nm e aquisição de dados em dois canais, um entre 400-600 nm (região verde-azul) referente à fluorescência natural do patógeno e outro entre 600-710 nm (região vermelho) referente à fluorescência dos compostos avaliados. Para os ensaios com azul de metileno, as imagens foram obtidas com excitação em dois comprimentos de onda diferentes, 405 e 594nm e obtidas em dois canais, 400-600 nm (região verde-azul) e 600-710 nm (região vermelho).

2-2.12 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MICROSCOPIA CONFOCAL

Fragmentos de *P. insidiosum* foram incubados por 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos. Em seguida foram lavados em água destilada autoclavada por cinco vezes

com agitação em vortex. Foram, então, dispostos em lamínulas e irradiados com 30 mW/cm^2 por 666 segundos e fluência de 20 J/cm^2 . Imediatamente após a Terapia Fotodinâmica, avaliou-se a morfologia dos fragmentos do patógeno em microscópio confocal. Este procedimento foi realizado para o Photogem[®] (10 mg/mL), Photodithazine[®] (1,0 mg/mL), azul de metileno (150 µg/mL) e clorina e6 (1,0 mg/mL). A aquisição de imagem também ocorreu em dois canais, um na região do verde-azul para visualizar a morfologia do patógeno e um na região do vermelho para detectar os compostos.

2-3 RESULTADOS

O *P. insidiosum* apresenta hifas cilíndricas, ramificadas com angulação reta e característica membranosa. Diferente dos zigomicetos, esse patógeno não apresenta micélios aéreos, e, por isso, seu crescimento ocorre de forma plana e radial. Dessa forma, uma maneira encontrada para avaliar o crescimento deste oomiceto foi através da medição da área de crescimento em diversos tempos de cultura e comparação dos fragmentos tratados com os do grupo controle. A Figura 9 mostra o crescimento do patógeno para os diferentes tempos de avaliação, 24, 48 e 168 horas, respectivamente (A) representa o grupo controle e (B) o grupo tratado com TFD (Photodithazine[®] – 1,0 mg/mL e 70 J/cm^2).

Figura 9 - Comparação das colônias de *Pythium insidiosum* do grupo controle (A) com as que receberam tratamento com 70 J/cm² e Photodithazine® na concentração de 1,0 mg/mL (B). Os números 1, 2 e 3 representam a idade da colônia, 24, 48 e 168h, respectivamente.

2-3.1 TAXA DE INIBIÇÃO

A Figura 10 apresenta taxas de inibição do crescimento *in vitro* de *P. insidiosum* 48 horas após serem submetidos a diferentes protocolos de Terapia Fotodinâmica utilizando Photogem® como composto fotossensibilizante, assim como os grupos controles que receberam a droga (25 mg/mL), Anfotericina B (100 µg/mL) ou luz (fluência de 70 J/cm²) isoladamente.

Figura 10 - Taxas de inibição de crescimento obtidas para os fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à TFD utilizando Photogem® como agente fotossensibilizador. Os parâmetros identificados com * referem-se aos grupos que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle e os identificados com + representam os grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo tratado com Anfotericina B (100 µg/mL).

A análise da taxa de inibição para os diversos parâmetros empregados com o Photogem® (concentração do fotossensibilizador e dose de luz) demonstram a resposta positiva do tratamento com a terapia fotodinâmica no isolado *in vitro*. As ações isoladas do fotossensibilizador (toxicidade no escuro) e da luz nas doses empregadas sobre o crescimento microbiano também foram investigadas. Nos parâmetros aqui avaliados, a luz, o Photogem® ou a Anfotericina B, isoladamente, exerceram efeito inibitório, entretanto, não foi significativo e o patógeno recuperou o crescimento equivalente ao grupo controle (sem tratamento) no final dos sete dias de avaliação. Os resultados dos grupos tratados (TFD) demonstram um efeito de inibição do crescimento para todos os parâmetros investigados, porém, os melhores resultados foram obtidos para os grupos com menores concentrações do fotossensibilizador e dose de luz de 70 J/cm². Ao aumentar a concentração da

porfirina, aumentou também o número de moléculas agregadas, que não são ativas para a TFD. Este fato pode ter resultado na diminuição do efeito fotodinâmico para as maiores concentrações avaliadas (15 e 25 mg/mL). Os grupos tratados com TFD e 10 mg/mL de Photogem[®] apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, e os grupos 30 J/cm² e 10 mg/mL e 70 J/cm² e as concentrações de 10 e 15 mg/mL apresentaram diferença estatística também em relação à anfotericina B, mostrando superioridade na TFD quando comparada ao tratamento com este antifúngico. Nenhum dos fragmentos tratados com 30 J/cm² e 10 mg/mL ou 70 J/cm² e 15 mg/mL apresentou crescimento e por isso no gráfico (Figura 10) não há barra de desvio padrão.

A Figura 11 apresenta as taxas de inibição para os ensaios utilizando Photodithazine[®] como fotossensibilizador, assim como dos grupos que receberam Photodithazine[®] (1,3 mg/mL), Anfotericina B (100 µg/mL) e luz (70 J/cm²) isoladamente.

Figura 11 - Taxas de inibição obtidas para os fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à Terapia Fotodinâmica utilizando clorina como agente fotossensibilizador. Os parâmetros identificados com * referem-se aos grupos que apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle e os identificados com + representam os grupos que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado com Anfotericina B (100 $\mu\text{g/mL}$).

As taxas de inibição do crescimento *in vitro* do patógeno do grupo tratado com TFD com os grupos marcados com * apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (sem tratamento). Observa-se que todos os grupos tratados com TFD apresentaram a taxa de inibição com diferença estatística em relação ao controle. Isto não foi observado para os grupos Anfotericina B, luz ou Photodithazine®. Os grupos marcados com + apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado com Anfotericina B. Isto pode ser observado, principalmente para maiores fluências, independente da concentração do composto. Todos os fragmentos tratados com 70 J/cm^2 combinado às concentrações aqui avaliadas foram inativados e por isso não apresentam barra de desvio padrão no gráfico. Isto também ocorreu para os grupos 30 J/cm^2 e 0,7 mg/mL e 50 J/cm^2 e 1,0 mg/mL . A taxa de inibição obtida para os ensaios com Photodithazine® foram superiores a 85% para todos os

parâmetros aqui avaliados. Consideramos os grupos que receberam 70 J/cm² como os melhores resultados obtidos uma vez que o grupo apresentou resposta homogênea com inativação de todos os fragmentos tratados. Esta resposta foi obtida independente da concentração do fotossensibilizador, o que pode indicar que a resposta tem uma maior dependência energética do que da concentração do composto. Essa homogeneidade de resposta é importante, uma vez que, se restarem hifas viáveis no tecido, a lesão certamente recidivará.

Os resultados obtidos nos grupos tratados com o Photodithazine[®] como fotossensibilizador foram superiores aos encontrados para o Photogem[®], nos parâmetros aqui investigados. O efeito superior da clorina sobre a inibição do crescimento microbiano, em comparação aos derivados de hematoporfirina, também foi observado em estudos com bactérias e fungos (76, 77). As clorinas apresentam uma maior eficiência quântica em comparação às porfirinas na produção do oxigênio singleto, resultando em um maior efeito fotodinâmico. Além disso, a menor agregação deste composto, também é um fator importante para sua ação superior.

Além das características dos fotossensibilizadores, é necessário levar em consideração a estrutura tridimensional do *P. insidiosum*. A morfologia do patógeno, com as hifas ramificadas e entrelaçadas, influencia diretamente na difusão dos fotossensibilizadores. É provável que a utilização de compostos que apresentam afinidade por este oomiceto auxilie a distribuição do composto por todas as hifas. Por outro lado, caso não exista essa afinidade, a distribuição destes compostos pode ocorrer de modo heterogêneo, ou seja, apenas nas hifas da superfície em contato com os fotossensibilizadores. A má distribuição destas drogas provoca inativação de apenas algumas células, deixando para trás hifas viáveis, que retomam o crescimento ao decorrer do tempo.

Observou-se também que o crescimento do *P. insidiosum* foi aumentado em algumas situações, sendo mais evidente no grupo que recebeu apenas luz. Essa resposta do aumento do crescimento celular frente ao estímulo luminoso é um fenômeno bastante relatado na literatura da fotoestimulação de mitose celular (89), o que, evidencia a importância do estudo da cinética do composto avaliado. Portanto, se a irradiação foi realizada em um momento no qual o composto não estava interagindo com o patógeno, pode ocorrer bioestimulação em vez de morte microbiana.

A Figura 12 apresenta as taxas de inibição obtidas para fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à terapia fotodinâmica com azul de metileno como composto fotossensibilizante. Os grupos que receberam azul de metileno (100 µg/mL), Anfotericina B (100 µg/mL) e luz (70 J/cm²), isoladamente, também foram avaliados.

Figura 12 - Taxas de inibição obtidas para os fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à Terapia Fotodinâmica utilizando azul de metileno como agente fotossensibilizador. Não houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos e, apesar de apresentar uma pequena inibição nas primeiras 48h, o crescimento foi normalizado no final dos sete dias de avaliação.

A terapia fotodinâmica realizada com azul de metileno não se mostrou eficaz na inativação do *P. insidiosum*. Apesar de apresentar uma pequena inibição nas primeiras 48 horas, o crescimento foi normalizado no final dos sete dias de análise. Este fato pode ser explicado pela heterogeneidade de danos causados no patógeno, ou seja, apesar de promover morte microbiana em algumas hifas, a técnica não foi suficiente para inativar toda a cultura, e por isso houve recuperação do crescimento

com o passar do tempo. Nenhum dos grupos apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ou anfotericina B.

A Figura 13 apresenta os melhores protocolos aqui avaliados para todos os tratamentos, Anfotericina B, TFD com azul de metileno, TFD com Photogem® e TFD com Photodithazine®.

Figura 13 – Taxas de inibição de crescimento de *P. insidiosum* para os melhores protocolos avaliados.

2-3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia do grupo controle revela hifas ramificadas, cilíndricas e largas, características de *P. insidiosum*. Outro aspecto importante é a integridade dessas hifas, uma vez que não se observou deposição de material amorfo ao seu redor (Figura 14).

Figura 14 - Microscopia eletrônica da varredura de fragmento de *P. insidiosum* do grupo controle. Destaque para a geometria cilíndrica das hifas e da integridade da parede celular.

A Figura 15 mostra um fragmento em que a TFD com Photogem® (30 J/cm² e 25 mg/mL) exerceu seu efeito deletério, entretanto o patógeno apresentou crescimento discreto com o passar do tempo. Estes efeitos são evidenciados na microscopia eletrônica de varredura uma vez que se observa o extravasamento de material amorfo em alguns pontos, demonstrando o efeito deletério e hifas íntegras, que explica o crescimento discreto no passar do tempo. Essa variação na resposta frente à terapia provavelmente se dá pela má distribuição do composto no fragmento do patógeno.

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photogem® (30 J/cm² e 25 mg/mL), mas que não foi inativado. Destaque para diferenciação da geometria cilíndrica da hifa além da presença de material amorfo em alguns pontos, o que sugere o rompimento da parede celular de algumas hifas (indicados com as setas).

O fragmento do patógeno inativado após ser submetido à terapia fotodinâmica apresenta perda da morfologia da hifa com extravasamento de material amorfo, que sugere o efeito da TFD (70 J/cm² e 10 mg/mL) principalmente em membranas, levando à morte celular (Figura 16).

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photogem® (70 J/cm² e 10 mg/mL) em que ocorreu a inativação do patógeno. Destaque para a perda da conformação cilíndrica, o enrugamento das paredes sugere uma modificação na quantidade de material intracelular e alteração da porção estrutural. Também pode ser observado o extravasamento de material amorfo sugerindo rompimento da parede celular das hifas.

A Figura 17 apresenta imagem de microscopia eletrônica de fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photodithazine® (30 J/cm² e 1,0 mg/mL) que apresentou crescimento após o tratamento. Nota-se em plano mais próximo o fragmento tratado e ao redor as hifas que cresceram após o tratamento. É possível observar as modificações na área tratada da morfologia da hifa como perda da sua conformação cilíndrica. A Figura 18 mostra, em detalhe, as hifas-filhas alteradas possivelmente por alguma alteração fisiológica ocasionada pela aplicação da TFD nas hifas-mães. Nota-se perda da integridade de muitas delas assim como achatamento e irregularidade na morfologia.

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photodithazine® (30 J/cm² e 1,0 mg/mL) em que não ocorreu a inativação do patógeno. O plano mais próximo (acima da linha tracejada) refere-se à região submetida à técnica e o plano mais distante (abaixo da linha tracejada) as hifas-filhas crescidas após o tratamento. Nota-se diferenciação de morfologia em ambas as regiões, com destaque para aparência achatada da região tratada.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photodithazine® (30 J/cm² e 1,0 mg/mL) em que não ocorreu a inativação do patógeno. A imagem refere-se às hifas-filhas. Destaque para a perda da conformação cilíndrica possivelmente devida alguma alteração fisiológica ocasionada pela Terapia Fotodinâmica.

A Figura 19 mostra fragmento de *P. insidiosum* submetido à terapia fotodinâmica utilizando Photodithazine® (70 J/cm² e 0,7 mg/mL) que foi inativado pela técnica.

Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura de um fragmento de *P. insidiosum* submetido à TFD com Photodithazine® (70J/cm² e 0,7 mg/mL) em que ocorreu a inativação do patógeno. Destaque para a perda da conformação cilíndrica, com o achatamento das hifas e desestruturação do biofilme, assim como extravasamento de material amorfo. Nesse caso, a resposta de destruição das hifas foi evidente em toda a amostra.

Na Figura 19 se observa a ruptura das hifas, assim como a deposição de grande quantidade de material amorfo. A estrutura membranosa das hifas do *Pythium insidiosum* não foi mais observada em nenhuma região. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada 30 dias após os ensaios de terapia fotodinâmica e, portanto, a deposição de material amorfo apresentada na Figura 19 pode ter ocorrido de forma gradual. Dessa forma, novos estudos com avaliação em microscopia eletrônica de varredura, imediatamente após a TFD, podem trazer novas e importantes informações sobre o processo de inativação das hifas.

2-3.3 CINÉTICA EM MICROSCOPIA CONFOCAL

A Figura 20 mostra imagem de microscopia confocal de fragmento de *P. insidiosum*. Observam-se hifas cilíndricas e largas características do patógeno. Os quadros B e C mostram marcação com safranina e acriflavina, respectivamente.

Figura 20 - Fluorescência natural de *P. insidiosum* na região do azul-verde (A). *P. insidiosum* marcado com safranina. Observa-se fluorescência na região verde-amarelo da parede celular e estrutura intracelular correspondente à celulose. (C) Núcleos de hifas de *P. insidiosum* marcados com acriflavina. A escala refere-se a 20 μm e aumento de 400X.

A emissão de fluorescência da safranina (Figura 20-B) evidencia a parede celular e estrutura celular cilíndrica específica. Bond e colaboradores descreveram a influência no comprimento de onda da fluorescência da safranina em função da composição celular e relatam que fluorescência na região verde-amarelo refere-se à parede celular rica em glicose (90). Essas evidências confirmam a descrição de composição de parede celular de oomicetos. Além da região de parede celular, observa-se a fluorescência em uma estrutura intracelular na mesma região espectral, sugerindo a mesma composição da parede. Provavelmente esta estrutura está relacionada à síntese de celulose, assim como estoque de polissacarídeos. Alexopoulos et al. descreveram uma estrutura intracelular denominada vacúolos de corpo denso, uma organela esférica presente somente em oomicetos (35). Mais tarde, Powell e Bracker investigaram esta estrutura no oomiceto *Phytophthora palmivora* e detectaram a presença de grande quantidade dos polissacarídeos mycolaminaran e mycolaminaran fosfato (36). Possivelmente a estrutura marcada com safranina é a mesma descrita por Alexopoulos vacúolos de corpo denso. Na Figura 20-C é possível ver as hifas marcadas com acriflavina, um composto com

afinidade por núcleo celular. Nota-se a presença de múltiplos núcleos na hifa do patógeno como descrito por Alexopoulos (35).

2-3.3.1 Incubação em solução de Photodithazine®

A Figura 21 mostra a distribuição do Photodithazine® nas hifas do patógeno em diferentes tempos de incubação. A fluorescência em azul-verde refere-se à fluorescência natural do *P. insidiosum* e em vermelho à emissão de fluorescência do Photodithazine®.

Figura 21 - Imagem de microscopia confocal de *P. insidiosum* imerso por 10, 30, 60, 360, 720, e 1440 minutos, respectivamente, em solução de Photodithazine® na concentração de 150 µg/mL e em seguida lavado por cinco vezes com agitação em vortex. A fluorescência em azul-verde representa a fluorescência natural do patógeno, e em vermelho a fluorescência do Photodithazine®. Destaque para a presença do composto no interior da hifa, independente do tempo de incubação, devido a uma provável afinidade da droga pelo patógeno. Quanto maior o tempo de incubação, maior a distribuição do composto no interior da hifa. A imagem foi obtida com aumento de 400X e a escala refere-se à 20 µm.

O Photodithazine® mostrou afinidade pelo patógeno, uma vez que com apenas 10 minutos de incubação foi possível observar o composto em estruturas intracelulares específicas. Para maiores tempos de incubação houve uma distribuição mais homogênea do composto por todo o citoplasma da hifa e, por último, parede e membranas celulares (Figura 21). Isto explica um provável mecanismo de distribuição da droga dentro da célula do patógeno, em que o composto é rapidamente absorvido por uma estrutura específica e depois distribuído por toda a célula.

Após a obtenção das imagens acima, as lamínulas foram mantidas em estufa a 37°C sem adição de solução contendo Photodithazine®. Novas imagens foram realizadas, 24h após as imagens da Figura 21 (Figura 22).

Figura 22 - Imagem de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* 24 horas após imersão em solução de Photodithazine® por 10, 30 e 60 minutos, respectivamente. Fluorescência em azul-verde relativa ao patógeno e em vermelho relativa ao Photodithazine®. Detalhe para o transporte do composto das hifas velhas para as hifas novas, sugerindo afinidade entre a droga e o patógeno. A imagem foi obtida com aumento de 400X e a escala refere-se à 20 µm.

Vinte e quatro horas após imersão em Photodithazine®, o fragmento de *P. insidiosum* ainda apresentava o composto no interior da célula. Além disso, observou-se maior acúmulo do fotossensibilizador em hifas jovens, que possivelmente cresceram nessas 24 horas. Por ser uma estrutura derivada de clorofila, a hifa pode reconhecer a estrutura e transportá-las até as hifas em formação, o que pode explicar a localização específica em estruturas esféricas nestas células. O fato de a própria célula transportar o composto às células-filhas garante uma boa e homogênea distribuição da droga e evidencia a baixa citotoxicidade no escuro do fotossensibilizador empregado, pois não inviabilizou o

surgimento e crescimento das células-filhas. O aumento da concentração influenciou na velocidade de penetração na hifa, entretanto, após 24 horas a localização do composto foi a mesma para todas as concentrações aqui avaliadas.

As estruturas intracelulares esféricas são muito semelhantes às observadas nos ensaios com safranina, sugerindo que estas estruturas possam estar relacionadas aos vacúolos de corpo denso, regiões de armazenamento de açúcar. Outra hipótese é de que por ser um derivado de clorofila a, o Photodithazine[®] poderia ter sua estrutura reconhecida pela hifa e transportada para estruturas de síntese de celulose, as quais também poderiam ter sido marcadas pela safranina. Analisando a molécula de Photodithazine[®] é possível ainda formular outra hipótese. Por se tratar de uma molécula anfifílica que, em meio biológico, apresenta carga negativa, este composto não se ligaria aos vacúolos de corpo denso, mas poderia facilmente se ligar às membranas. Este fato explicaria o motivo do composto ser enviado para as células filhas mesmo após o período de incubação na solução de fotossensibilizador. Para determinação destas estruturas intracelulares novos ensaios utilizando marcadores moleculares específicos deverão ser realizados.

2-3.3.2 Incubação em solução de Photogem[®]

A Figura 23 mostra a distribuição do Photogem[®] nas hifas do patógeno em diferentes tempos de incubação. Em azul-verde observa-se a emissão de fluorescência do patógeno e em vermelho a emissão de fluorescência do Photogem[®].

Figura 23 - Imagens de microscopia confocal de fragmento de *P. insidiosum* imerso em solução de Photogem® por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. A fluorescência em azul-verde evidencia a fluorescência natural do patógeno e em vermelho do Photogem®. É possível observar a penetração do composto nas hifas do patógeno para tempos de incubação superiores a 1 hora. Além disso, para tempos maiores de 6 horas, a droga também se localizou em região de parede e membranas celulares. Apesar de se distribuir pela hifa, isto não aconteceu de forma difusa e homogênea. A imagem foi obtida com aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.

O Photogem® se concentrou na superfície da parede celular nos tempos de incubação de 10 e 30 minutos. A maior concentração da droga nas hifas velhas pode ser explicada pela estrutura formada, que talvez esteja mantendo o fotossensibilizador na superfície. Para uma hora de incubação do composto, é possível observar o Photogem® em todo o interior da hifa, sem uma localização específica. A partir de 6 horas, além da concentração na região intracelular, o composto concentrou-se também na região de parede e membranas celulares. É importante salientar que apesar do Photogem® ter se distribuído pela hifa, isto não ocorreu de maneira homogênea (Figura 23).

2-3.3.3 Incubação em solução de Azul de metileno

A Figura 24 mostra a localização do azul de metileno para diferentes tempos de incubação. Em azul-verde, fluorescência emitida pelo patógeno e em vermelho, fluorescência emitida pelo azul de metileno.

Figura 24 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *Pythium insidiosum* imersos em solução de azul de metileno na concentração de 150 µg/mL por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. Fluorescência em azul-verde do patógeno e em vermelho do composto. Destaque para a presença do composto no interior das células para todos os tempos de incubação avaliados. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.

O azul de metileno não penetrou na célula microbiana em nenhum dos tempos de incubação avaliados. Observou-se apenas o composto na superfície das hifas e este foi facilmente removido quando lavado. Por apresentar carga positiva, é bem provável que este composto não consiga entrar na célula microbiana. Outra hipótese pode ser baseada no efluxo celular. Este mecanismo é utilizado por micro-organismos resistentes a algumas drogas antimicrobianas como uma forma de expulsar esta medicação. Os fenotiazínicos azul de metileno e azul de toluidina são cátions anfipáticos e física e quimicamente similares a um alcaloide antibacteriano, e,

por isso, poderiam também ser expulsos de algumas células microbianas (91). Mecanismos similares a este poderiam ser utilizados pelo *P. insidiosum* e, talvez, explicar a remoção do azul de metileno da célula.

2-3.3.4 Incubação em solução de Clorina e6

A localização da clorina e6 em função dos diversos tempos de incubação é mostrada na Figura 25. O patógeno emite fluorescência na região do azul-verde e a clorina e6 no vermelho.

Figura 25 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* imersos por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. Fluorescência azul-verde relativa à fluorescência natural do patógeno e fluorescência na região do vermelho relativa à clorina e6. Nos primeiros 10 minutos já é observado o composto ligado a estruturas intracelulares específicas. À medida que aumenta o tempo de incubação, o composto distribui-se por toda a hifa, atingindo parede e membranas celulares para tempos maiores de 1 hora. A escala refere-se à 20 µm. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.

A clorina e6, solúvel em DMSO, apresentou rápida penetração nas hifas do patógeno, além de concentração em estruturas intracelulares específicas, para todos

os tempos de incubação avaliados. Para maiores tempos de incubação, percebeu-se maior distribuição do composto no interior das hifas, assim como anteriormente descrito para o Photodithazine®.

A semelhança entre a localização do Photodithazine® e da clorina e6 era esperada, uma vez que possuem estruturas moleculares muito parecidas. A diferença entre os dois compostos está na forma como são solubilizados. O Photogem®, por ser um sal de glucamina, é facilmente solúvel em água, enquanto a clorina e6, por estar na forma de ácido, é mais anfifílica e por isso é solubilizada primeiramente em DMSO.

2-3.3.5 Incubação em solução de Photogem® e Photodithazine®

A Figura 26 mostra a localização da mistura de Photogem® e Photodithazine® em função do tempo de incubação. A fluorescência emitida na região azul-verde refere-se à emissão natural do patógeno e a fluorescência em vermelho, à emissão da mistura de fotossensibilizadores.

Figura 26 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* imersos em solução contendo Photodithazine® e Photogem® na proporção 1:1 por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. Nos primeiros tempos de incubação verifica-se fluorescência no interior da hifa, provavelmente referente ao Photodithazine® e na região de parede e membranas celulares, provavelmente referente ao Photogem®. O aumento do tempo de incubação melhorou a distribuição da solução nas hifas, seja na região de parede ou na região intracelular. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.

Nos ensaios com incubação do fragmento de *P. insidiosum* em solução contendo Photogem® e Photodithazine® na proporção 1:1, observou-se que com apenas 10 minutos de incubação, houve emissão de fluorescência nas estruturas intracelulares esféricas indicando a presença de fotossensibilizador. Ainda não foi possível discriminar a localização de cada fotossensibilizador, mas se os resultados coincidirem com os dos fotossensibilizadores isolados, provavelmente o Photodithazine® se concentrou nas estruturas intracelulares e o Photogem® na parede e membranas celulares (fato este também observado após 24h). A solução combinada de alguma forma acelerou o processo de penetração de ambas as drogas. A localização simultânea em duas regiões distintas da hifa é uma grande vantagem para a TFD uma vez que durante a irradiação dois alvos serão afetados pela técnica.

2-3.3.6 Incubação em solução de Photodithazine® e Azul de Metileno

A Figura 27 mostra imagens de microscopia confocal obtidas de fragmentos de *P. insidiosum* imersos em solução de Photodithazine® e Azul de Metileno na proporção 1:1 em diferentes tempos de incubação.

Figura 27 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* imersos em solução contendo azul de metileno e Photodithazine® na proporção 1:1 por 10, 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos, respectivamente. Observa-se presença dos compostos em estruturas intracelulares do patógeno para todos os tempos de incubação. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.

As imagens mostram concentração da solução em estruturas intracelulares, correspondentes às observadas anteriormente nos ensaios de Photodithazine®, sugerindo a ausência de sinergismo entre os compostos. Não foi possível a detecção de azul de metileno no interior da hifa.

A Tabela 2 apresenta a localização dos diversos fotossensibilizadores nas hifas do *P. indiosum* em função do tempo de incubação.

Tabela 2 - Localização dos fotossensibilizadores nas hifas de *P. indiosum* em função do tempo de incubação.

		Tempo (minutos)					
		10	30	60	360	720	1440
Photogem[®]	Superfície Externa	*	*				
	Parede/ Membranas		*	*	*	*	*
	Citoplasma		*	*	*	*	*
	Estruturas Intracelulares						
Photodithazine[®]	Superfície Externa						
	Parede/ Membranas			*	*	*	*
	Citoplasma		*	*	*	*	*
	Estruturas Intracelulares	*	*	*	*	*	*
Azul de Metileno	Superfície Externa	*	*	*	*	*	*
	Parede/ Membranas						
	Citoplasma						
	Estruturas Intracelulares						
Clorina e6	Superfície Externa						
	Parede/ Membranas			*	*	*	*
	Citoplasma		*	*	*	*	*
	Estruturas Intracelulares	*	*	*	*	*	*
Photogem[®] / Photodithazine[®]	Superfície Externa						
	Parede/ Membranas	*	*	*	*	*	*
	Citoplasma		*	*	*	*	*
	Estruturas Intracelulares	*	*	*	*	*	*
Azul de Metileno/ Photodithazine[®]	Superfície Externa						
	Parede/ Membranas						*
	Citoplasma	*	*	*	*	*	*
	Estruturas Intracelulares	*	*	*	*	*	*

2-3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MICROSCOPIA CONFOCAL

2-3.4.1 Terapia fotodinâmica com Photodithazine®

A Figura 28 apresenta os fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à TFD após imersão em Photodithazine® por 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos.

Figura 28 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* antes (A) e imediatamente após tratamento com TFD após imersão por 30 (B), 60 (C), 360 (D), 720 (E) e 1440 minutos (F) em solução de Photodithazine® na concentração de 1,0 mg/mL. Em (A) observa-se hifa cilíndrica, ramificada, pouco septada, e com parede celular bem definida. (B) Observa-se parede e membranas celulares bem definidas com regiões de ausência de fluorescência relativas às estruturas intracelulares. Em (C, D, E e F) nota-se ruptura de parede celular com extravasamento e deposição de material amorfo. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 µm.

A Figura 28-B refere-se ao fragmento imerso por 30 minutos. De acordo com a cinética avaliada anteriormente, neste período, o composto localiza-se principalmente em estruturas intracelulares específicas. Após a terapia fotodinâmica observa-se parede e membranas celulares bem definidas e regiões de ausência de fluorescência relativas à presença das estruturas intracelulares. Neste caso, o efeito

da TFD foi localizado, especificamente, nas estruturas intracelulares. Esta alteração nas estruturas intracelulares pode explicar a diferença morfológica observada nas hifas-filhas após a TFD na microscopia eletrônica de varredura. Apesar de não haver rompimento de parede celular, o patógeno não apresentou crescimento após o tratamento. Em contrapartida, para os maiores tempos de incubação, a cinética revelou a presença do composto nas regiões de parede e membranas celulares, e isso foi comprovado com a ruptura das hifas e extravasamento e deposição de material amorfo após a TFD. Este efeito também foi observado anteriormente nas imagens de microscopia eletrônica de varredura. O ensaio sugere que maiores tempos de incubação podem aumentar a eficiência da TFD. Esses resultados explicam as altas taxas de inibição obtidas para este fotossensibilizador.

2-3.4.2 Terapia fotodinâmica com Photogem®

Os resultados da TFD em fragmentos imersos em solução de Photogem® por 30, 60, 360, 720 e 1440 minutos são apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* antes e após tratamento com TFD após imersão em solução de Photogem® na concentração de 10 mg/mL. (A) Fragmento controle com hifas cilíndricas e bem definidas. Em (B, C, D, E e F) observam-se regiões de ausência de fluorescência relativas às hifas inativadas, envoltas por regiões de hifas bem delimitadas. Isto comprova a distribuição heterogênea do Photogem entre as hifas. Este fato é mais evidente para tempos de incubação superiores a 6h (E e F), quando o composto localiza-se nas regiões intracelular e parede e membranas celular. Além disso, nos quadros de B-D observa-se Photogem® não degradado durante a TFD. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se à 20 μ m.

A Figura 29 revela a distribuição heterogênea do Photogem® nas hifas do patógeno. As hifas que entraram em contato com o Photogem® foram inativadas, enquanto outras não. Dessa forma, apesar de haver inibição, o patógeno recupera o crescimento devido às hifas íntegras que restaram. Estes achados explicam a inativação observada nas primeiras 24 horas e retomada do crescimento no final dos sete dias avaliados. Além disso, observa-se emissão de fluorescência do Photogem® nos quadros de B-D. Isto significa que nem todo o composto disponível foi degradado durante a TFD, possivelmente por apresentarem a forma de agregados, os quais não são ativos para a técnica. Outra evidência da resposta heterogênea da TFD, é que a fluorescência do Photogem® coincide com hifas cilíndricas e íntegras, as quais provavelmente não sofreram qualquer tipo de dano. Danos maiores foram observados para tempos de incubação superiores a 6h, quando o composto localizou-se na região intracelular e em parede e membranas celulares.

2-3.4.3 Terapia fotodinâmica com clorina e6

Os resultados obtidos para os ensaios de TFD com a clorina e6 são apresentados na Figura 30.

Figura 30 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à TFD após imersão em solução de clorina e6 na concentração de 1,0 mg/mL. Em (A) observa-se paredes celular íntegras com regiões intracelulares de ausência de fluorescência, possivelmente relativas às estruturas intracelulares que foram oxidadas com a TFD. Em (B, C, D e E) observa-se rompimento de parede celular, extravasamento e deposição de material amorfo, possivelmente devido a localização do composto nas regiões de parede e membranas celulares. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 μ m.

Os resultados obtidos para a clorina e6 são semelhantes aos obtidos para o Photodithazine[®]. Em maiores tempos de incubação há maior concentração dos compostos nas regiões de parede e membranas celulares e, por isso, observa-se ruptura celular e extravasamento e deposição de material amorfo. Já para incubação de 30 minutos, em que o composto está mais localizado nas estruturas intracelulares, ocorre oxidação destas estruturas, mas mantém a estrutura esquelética intacta. Este fato sugere que maiores tempos de incubação podem aumentar a eficiência da TFD e evitar recidivas.

2-3.4.4 Terapia fotodinâmica com azul de metileno

As imagens de microscopia confocal após TFD com azul de metileno são expostas na Figura 31.

Figura 31 - Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *P. insidiosum* submetidos à TFD após imersão em solução de azul de metileno na concentração de 1,0 mg/mL por 30 (B), 60 (C), 360 (D), 720 (E) e 1440 minutos (F). A TFD não causou efeito na morfologia das hifas, nem alterou o crescimento do patógeno. As imagens foram obtidas para aumento de 400X e a escala refere-se a 20 μ m.

A TFD com azul de metileno não se mostrou eficiente para a inativação do patógeno. Este fato já havia sido observado em ensaios anteriores e pode ser comprovado com as imagens de microscopia confocal que mostram hifas cilíndricas e íntegras. A ausência de danos causada pela TFD com azul de metileno nas hifas do patógeno pode ser explicada pela localização diferenciada em relação aos fungos verdadeiros, os quais apresentam resposta satisfatória à TFD com este composto. Além disso, a teoria proposta por Zeina e colaboradores também pode explicar a baixa susceptibilidade do patógeno, uma vez que para células eucarióticas são necessários danos em diferentes estruturas para causar morte celular (71). Caso isto

se aplique ao *P. insidiosum*, maiores fluências e concentrações da droga poderiam causar algum dano às células deste oomiceto.

2-4 DISCUSSÃO

Diversos estudos investigaram a susceptibilidade do *P. insidiosum* às drogas antifúngicas com resultados contraditórios. Sekhon e colaboradores investigaram o efeito dos poliênicos e azóis na inativação do *P. insidiosum*. Entretanto, somente os azóis mostraram-se eficiente (56). Outro estudo avaliou os antimicóticos anfotericina B, flucitosina, miconazol e griseofulvina, os quais não inibiram o crescimento *in vitro* do oomiceto, enquanto que o itraconazol apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *P. insidiosum* (92). Cavalheiro e colaboradores avaliaram o efeito da terbinafina associada à caspofungina, miconazol, cetoconazol e fluconazol sobre o crescimento *in vitro* do patógeno. Sinergismos foram observados para terbinafina associada à caspofungina e anfotericina B, isoladamente. Os autores revelam a variação de susceptibilidade entre as cepas de *P. insidiosum* possivelmente relacionado à variabilidade genética (93-95). A atividade dos antibióticos macrolídeos e tetraciclínicos também foi avaliada, com bons resultados (96).

A terapia fotodinâmica apresenta algumas vantagens em relação às drogas antimicóticas. Diferente desses fármacos, a TFD tem diversos alvos potenciais para oxidação como proteínas, enzimas e lipídios insaturados, o que dificulta qualquer mecanismo de resistência e diminui a variação de susceptibilidade entre os isolados (97). Neste trabalho, optou-se por avaliar o efeito da terapia fotodinâmica nas hifas do patógeno, uma vez que a morfologia influencia diretamente na resposta frente à técnica. Os trabalhos de inativação *in vitro* referenciados aqui avaliaram o efeito dos diversos antifúngicos em zoósporos de *P. insidiosum*, que é a forma infectante e não a forma em que o patógeno se encontra na lesão. Os zoósporos são estruturas unicelulares, portanto mais susceptíveis aos danos oxidativos, enquanto as hifas organizadas em estrutura tridimensional membranosa já formam um sistema mais complexo e tridimensional. Tanto a difusão do fotossensibilizador, como a iluminação homogênea em função da penetração no biofilme são menos efetivas. As

taxas de inibição de crescimento de *P. insidiosum* revelam o potencial da terapia fotodinâmica principalmente quando se utilizou Photodithazine[®] como fotossensibilizador. Ao variar os parâmetros avaliados, observou-se maior dependência das fluências do que das concentrações dos compostos. A melhor resposta foi obtida para 70 J/cm², independente da concentração da droga utilizada. Quando comparada a outros estudos de TFD em micro-organismos, os parâmetros de luz e fotossensibilizador avaliados aqui são muito elevados. Este fato é justificado pela estrutura do patógeno, seja pela composição e arranjo da parede celular e membranas, bem como pelo posicionamento das hifas, que tendem a formar um micélio com forte característica membranosa.

Os estudos com Photogem[®] exigiram alta concentração da droga para que ocorresse inibição de crescimento do patógeno, entretanto, em altas concentrações a porfirina produz agregados que não são ativos para a TFD. Este fato explica porque para altas concentrações do composto houve menor inibição do crescimento do patógeno quando comparadas às concentrações menores.

Os ensaios com azul de metileno não mostraram inativação do *P. insidiosum* em todos os protocolos aqui avaliados. Isto também foi observado nos ensaios com microscopia confocal. Este resultado difere de muitos relatos da literatura em que o azul de metileno se mostra muito eficiente na inativação microbiana como *Candida albicans* (98).

Foram realizados ensaios com Anfotericina B visando comparar os resultados obtidos para a TFD com uma droga antifúngica utilizada como tratamento convencional da pitiose. As taxas de inibição dos fragmentos que foram tratados com este antifúngico foram muito inferiores às obtidas pelos protocolos de TFD aqui avaliados, em torno de 10 e 100 %, respectivamente.

As imagens de fluorescência do patógeno corado com safranina evidenciaram a presença de celulose em duas regiões diferentes da hifa do oomiceto, na parede celular e uma organela intracelular específica. Provavelmente estas organelas são os vacúolos de corpos densos encontrados apenas em oomicetos. Estruturas semelhantes foram observadas para os ensaios de cinética com Photodithazine[®] e clorina e6.

Os estudos de cinética explicam a maior eficiência do Photodithazine[®] quando comparada ao do Photogem[®] e azul de metileno. A penetração do Photodithazine[®] e concentração em estruturas específicas revelam uma provável

afinidade do composto pelo *P. insidiosum*. Este fato também foi verificado ao investigar a clorina e6. O Photodithazine[®] e a clorina e6 diferem primeiramente em relação à solubilidade, sendo que a e6 apresenta solubilidade em DMSO e o Photodithazine[®], em água. Além disso, estes compostos diferem quanto às características químicas, uma vez que o Photodithazine[®] está na forma de sal de glucamina e a clorina e6 na forma de ácido. Apesar destas diferenças, estes compostos apresentaram comportamento farmacocinético semelhante, com rápida penetração na hifa do patógeno e ligação a uma estrutura celular específica. O aumento do tempo de incubação melhorou a distribuição dos compostos por toda a célula microbiana, atingindo parede e membranas em tempos maiores que 60 minutos. O azul de metileno não penetrou na hifa e assim, não foi eficiente na inativação do patógeno.

Os ensaios de cinética para as soluções de fotossensibilizadores combinados confirmam a afinidade dos compostos por regiões específicas da hifa. Os fragmentos imersos em solução de Photodithazine[®] e Photogem[®] apresentaram fluorescência nas regiões da parede e membranas celulares e em estruturas intracelulares. Este fato se dá, provavelmente, pela presença do Photogem[®] na parede e membranas celular e do Photodithazine[®] nas estruturas intracelulares. Apesar da mistura de compostos não ter alterado a localização das drogas, a velocidade de ligação de cada composto com as estruturas específicas foi maior, sugerindo um sinergismo entre os fotossensibilizadores facilitando a penetração na célula. Os ensaios com Photodithazine[®] e azul de metileno apresentaram fluorescência em estruturas intracelulares, citoplasma e parede e membranas como observado anteriormente para o Photodithazine. Não foi possível identificar a presença do azul de metileno no interior da célula.

O efeito da Terapia Fotodinâmica observado em microscópio confocal revela a importância do tempo de incubação e como a localização do composto influencia diretamente no efeito fotodinâmico causado na célula microbiana. Os estudos com Photodithazine[®] e clorina e6 apresentaram resultados semelhantes. Em tempos de incubação inferiores a uma hora, o composto está localizado principalmente em estruturas intracelulares e, por isso, após TFD não há ruptura de parede e membranas celulares. O efeito da técnica é localizado apenas nesta região intracelular. Este fato pode explicar porque, quando houve crescimento, as hifas-filhas apresentaram alterações morfológicas como mostrado nas imagens de

microscopia eletrônica de varredura. Dessa forma, a TFD foi mais eficiente para tempos de incubação superiores a uma hora, em que houve ruptura das células microbianas com extravasamento e deposição de material amorfo. Outro aspecto importante da interação entre o Photodithazine[®] e o patógeno é o fato do composto ser transportado para as hifas novas, mesmo quando o fragmento não estava imerso no fotossensibilizador. Provavelmente, o *P. insidiosum* reconhece a estrutura do Photodithazine[®] como alguma molécula necessária a sua sobrevivência e, por isso, a distribui por todas as hifas. Este fato é extremamente importante, pois uma distribuição homogênea garante morte celular de todas as hifas, evitando recuperação de crescimento. A provável estrutura intracelular que interage com as clorinas são denominados vacúolos de corpo denso, descritos por Powell e Bracker para o oomiceto *Phytophthora palmivora* (36). Os autores sugeriram que nestes vacúolos contém grande quantidade de polissacarídeos micolaminaran e micolaminaran fosfato, os quais poderiam se ligar facilmente às clorinas devido sua estrutura química. Esta estrutura está envolvida na reprodução e isso poderia explicar o transporte intracelular do composto. Outra hipótese, baseada na estrutura molecular das clorinas é a ligação com membranas celulares, uma vez que em meio biológico, as moléculas apresentam carga negativa e por isso não se ligaria a estes vacúolos. Isto também explica o transporte para as hifas-filhas, uma vez que as membranas seriam capazes de distribuir o composto por toda a célula. Ensaios com marcadores específicos são necessários para comprovar esta possível interação.

O Photogem[®] não é bem distribuído nas células do patógeno e por isso o efeito fotodinâmico não é homogêneo, sendo algumas hifas, inativadas e outras não. Isto explica porque, com o passar do tempo, as colônias recuperaram o crescimento. Um fato importante é que o Photogem[®] se liga a alguma molécula responsável pela fluorescência natural da parede celular do patógeno. Por isso, quando ocorre inativação da hifa, verifica-se ausência de fluorescência, bem diferente dos outros compostos, que apesar de romper as hifas, ainda há fluorescência das células. A interação da droga com o patógeno foi maior à medida que aumentou o tempo de incubação, entretanto 24 horas não foi suficiente para uma distribuição uniforme. Os resultados obtidos para as taxas de inibição, estudo de cinética e efeito morfológico da terapia fotodinâmica coincidem e explicam a baixa eficiência do Photogem[®] como fotossensibilizador da TFD na inativação do *P. insidiosum*.

A TFD com azul de metileno não se mostrou eficiente para a inativação do patógeno. O composto não penetrou na célula microbiana, e por isso não foi eficiente para causar dano celular, independentemente do tempo de incubação avaliado. Esses resultados coincidem com as baixas taxas de inibição observadas. Dessa forma, o azul de metileno não é o composto de escolha para TFD na inativação do *P. insidiosum*.

As associações de fotossensibilizadores não mostraram distribuições muito diferentes daquelas obtidas para os compostos isolados. Ao utilizar Photogem[®] e Photodithazine[®] na proporção 1:1, observou-se localização rápida em estrutura intracelular e em região de parede, tornando a ideia de misturas de compostos atraente. Entretanto, nos ensaios de TFD com Photogem[®] isoladamente, observou-se grande heterogeneidade em sua distribuição na hifa do oomiceto. Este fato representa uma preocupação em deixar hifas saudáveis após o término da TFD. Por isso, é mais indicado deixar as clorinas incubadas por um tempo superior à uma hora, tempo em que há localização em região intracelular e de parede, semelhante à composição de fotossensibilizadores.

Jackson e colaboradores investigaram a morte microbiana *in vitro* de *Candida albicans* nas formas de levedura e pseudo-hifa. Avaliou-se a energia, tempo de incubação e concentração do azul de toluidina. Os autores concluíram que a TFD foi efetiva para ambas as formas de *Candida*. Além disso, a morte microbiana mostrou ser energia dependente e o tempo ótimo de incubação de 5 minutos para leveduras, enquanto que o tempo de incubação não influenciou a resposta da TFD em hifas (99). Wainwright descreveu a importância do tempo de incubação, uma vez que os compostos localizam-se primeiramente na parede celular e, portanto curtos tempos de incubação são necessários para dano nessa região. Entretanto, para danificar estruturas intracelulares é necessária uma longa incubação, pois os compostos levam um tempo maior para se concentrar nestas estruturas. (100). Estes resultados explicam os observados neste trabalho para o Photogem[®], entretanto o oposto ocorreu para o Photodithazine[®]. Diferente dos outros compostos, este apresenta rápida penetração em estruturas intracelulares, e acúmulo em citoplasma e membranas e parede celular para longos períodos de incubação. Estes fatos evidenciam a necessidade de adequação dos parâmetros utilizados para diferentes espécies microbianas.

Os resultados obtidos nestes estudos, seja para taxa de inibição, cinética e efeito morfológico da TFD, mostram que os melhores compostos para inativação do *P. insidiosum* são as clorinas. Além disso, comprovou-se que o tempo de incubação está diretamente relacionado ao dano causado e, por isso, tempos de incubação superiores a uma hora são provavelmente mais indicados para a TFD. Nos ensaios *in vitro* para cálculo de taxa de inibição fixou-se o tempo de incubação para 20 minutos, uma vez que estes foram os primeiros estudos realizados para observar a possível susceptibilidade do *P. insidiosum* à TFD. Além disso, o microscópio confocal foi instalado no final de 2011, por isso não foi possível realizar novos testes para cálculo de taxa de inibição a partir das informações obtidas nos estudos de cinética. Em uma futura investigação, novos ensaios variando o tempo de incubação podem comprovar o efeito observado em microscopia confocal.

Astaxas de inibição do crescimento *in vitro* do patógeno obtidas para a terapia fotodinâmica mostraram-se equivalentes ou superiores às descritas na literatura para as drogas antimicóticas, comprovando o potencial da terapia fotodinâmica na inativação do patógeno.

CAPÍTULO 3 – TERAPIA FOTODINÂMICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE PITIOSE

Após a verificação dos resultados *in vitro* promissores com as clorinas na inativação do *Phythium insidiosum*, a avaliação da resposta da terapia fotodinâmica para o controle microbiano no tecido infectado foi realizada. A cinética do fotossensibilizador no organismo e posterior distribuição na lesão, a iluminação do tecido infectado e, conseqüentemente a resposta final são bem mais complexas do que em uma ação direta sobre o micro-organismo. Uma resposta favorável no estudo *in vitro*, nem sempre é observada com a mesma eficiência no estudo *in vivo*. Além disso, os parâmetros relacionados ao fotossensibilizador e à iluminação deverão ser adequados ao tecido alvo.

3-1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de verificar a utilização da TFD no tratamento da pitiose, avaliou-se o efeito da técnica em modelo experimental da infecção. Apesar de a lesão experimental apresentar características ópticas bem diferentes das lesões naturais, este ensaio é o único modelo descrito até o momento e foi importante para investigar a distribuição dos compostos nos animais assim como a possível seletividade destas drogas pela lesão de pitiose. Além disso, importantes informações relativas à fluência e intensidade luminosa necessárias para o tratamento destas lesões puderam ser obtidas.

3-2. MATERIAL E MÉTODOS

3-2.1 INDUÇÃO DE ZOOSPORANGÊNESE

Os isolados de *P. insidiosum* utilizados neste estudo foram obtidos de um caso de pitiose equina (Isolado Eq-6) e do único caso de pitiose humana no Brasil (Isolado B01). Rotineiramente esses isolados são cultivados em Sabouraud Dextrose Agar (4% - Difco®) e mantidos em estufa a 37°C. O isolado B01 foi obtido em 2002 e desde então vem sendo mantido nestas condições. Este fato dificultou a indução de zoosporangênese deste isolado, uma vez que com a diminuição de nutrientes do meio de cultura, processo requerido para a obtenção *in vitro* de zoósporos, conforme descrito por Mendoza e Prendas o isolado apresentava fraco crescimento e sequer era observado parasitismo na gramínea (38). Esta metodologia também foi avaliada para os outros isolados, sem sucesso.

Outras metodologias foram utilizadas, como a diminuição lenta e contínua de nutrientes disponíveis no meio de cultura, iniciando com o BHI-Sangue, BHI, Corn Meal Agar e Agar-água, também sem sucesso. Apesar de haver crescimento do patógeno em todos os meios de cultura, este não parasitava a gramínea e, portanto, não havia produção de zoósporos.

Mendoza (Informação pessoal)² alertou que o problema poderia ser a presença de antifúngico natural das gramíneas, e que uma alternativa seria lavar bem as gramíneas com água e sabão neutro antes de serem autoclavadas. Além disso, o processo de diminuição de nutrientes disponíveis no meio de cultura deveria ser realizado em três etapas: cultivo em SDA (4%), SDA (2%) e finalmente em Ágar-água com a gramínea. Dessa forma, cada cultivo foi mantido por 24h em estufa a 37°C. Após este processo, as gramíneas parasitadas foram colocadas em garrafas plásticas estéreis (75 cm² - TPP®) contendo 30 mL de meio líquido de indução (Figura 32). A formação de esporângio e liberação de zoósporos foi observada em microscópio invertido (ZEISS®) com aumento de 40X. A contagem dos zoósporos foi realizada em Câmara de Neubauer para obtenção de 20.000 zoósporos por mililitro.

² Mendoza, L. Mensagem recebida por mendoza9@msu.edu em 19 jan. 2011.

Figura 32 - (A) Blocos de DAS a 2% contendo hifas de *P. insidiosum* cultivados em Agar-água para obtenção do parasitismo em gramínea. (B) Parasitismo em gramínea e formação de esporângios de *P. insidiosum* em meio líquido de indução. (C) Destaque para esporângio e maturação de zoósporos de *P. insidiosum*. (D) Liberação de zoósporos de *P. insidiosum* em meio de indução.

Vídeo <http://dl.dropbox.com/u/34479164/zoosporogenese.wmv>

3-2.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Inicialmente foram utilizados nove coelhos da raça Botucatu, com idade entre 45 e 60 dias e com aproximadamente 2 kg. A inoculação foi feita segundo protocolo estabelecido por Miller e Campbell, cujo inóculo consistiu de meio líquido de indução contendo 20.000 zoósporos/mL por via subcutânea na região dorsal (60). Posteriormente, avaliou-se a inoculação subcutânea em mais 21 coelhos, nas mesmas condições de idade e peso, sendo estes inoculados na região tibial do membro anterior. Para a realização dos procedimentos de inoculação, por este ser rápido, não houve a necessidade de se realizar qualquer tipo de sedação nos

animais. Importante informar que foi obtida a aprovação junto ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA-IBB, UNESP/Botucatu) para a utilização desses animais no presente trabalho (ANEXO A).

3-2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

Foram utilizados Photogem[®] (Photogem[®], Moscou – Rússia) na concentração de 1,5 mg/kg e Photodithazine[®] (Photodithazine[®], Moscou – Rússia) na concentração de 1,0 mg/kg, administrados através da veia auricular por meio de cateter 22G (BD & Co, EUA).

3-2.4 FONTE LUMINOSA

Para os ensaios com Photogem[®] foi utilizado equipamento de LEDs emitindo em 630 nm, com irradiância de 150 mW/cm². Para os ensaios com Photodithazine[®] foi utilizado laser de diodo (QuantumTech[®]) emitindo em 660 nm, 150 mW/cm².

3-2.5 TERAPIA FOTODINÂMICA

Os coelhos, previamente fotossensibilizados, foram anestesiados com 40 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina por via intramuscular como medicação pré-anestésica e mantidos em anestesia inalatória com isoflurano (1,5–2 %). Após este procedimento, realizou-se tricotomia e medição das lesões. Em seguida foi realizada a irradiação em uma área de aproximadamente 12 cm² e fluência de 200 J/cm². Lesões maiores tiveram um maior número de pontos de irradiação (Figura 33).

Figura 33 - (A) Administração intravenosa do fotossensibilizador com auxílio de cateter. (B) Animal mantido em anestesia inalatória. (C) Irradiação da lesão experimental de pitiose.

3-2.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Com o intuito de avaliar a cinética e garantir a presença do fotossensibilizador na lesão no momento da realização da TFD, as lesões foram monitoradas por espectroscopia de fluorescência através de um sistema portátil composto por um laser de diodo em 405 nm, um espectrômetro (USB 4000, Ocean Optics), uma sonda óptica do tipo Y e um laptop. A leitura é realizada com a sonda diretamente em contato com a superfície do tecido a ser investigado. O laser é direcionado ao tecido através de uma fibra óptica de 600 μm de diâmetro e excita o fotossensibilizador presente no tecido, induzindo a fluorescência. A emissão da fluorescência de moléculas do fotossensibilizador no tecido superficial pode ser parcialmente coletada pela segunda fibra óptica do sistema, que direciona a luz ao espectrofotômetro. O software processa a leitura do espectrofotômetro e os dados de intensidade de luz pelo comprimento de onda de emissão são obtidos e salvos. Como resultado, pode-se identificar a presença do fotossensibilizador e obter uma medida relativa da sua quantidade.

3-2.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A resposta da TFD foi avaliada através de cortes histopatológicos da lesão. Nos animais com lesão induzida na região dorsal, a biópsia foi realizada 72 horas

após o tratamento com TFD. Já os animais com lesão induzida na região tibial de membro anterior, a biópsia foi realizada 30 dias após o tratamento. Foram utilizadas duas colorações diferentes, hematoxilina-eosina a fim de observar a resposta imunológica, assim como danos causados ao tecido e Grocott, coloração específica para detecção de fungos.

Esse protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP/Botucatu, protocolo número 208.

3-2.8 NESTED-PCR

Para confirmar a presença do *P. insidiosum* na lesão experimental, realizou-se re-isolamento do patógeno e extração de DNA do tecido infectado para avaliação por Nested-PCR, utilizando-se primers específicos para *P. insidiosum*; como proposto por Grooters e Gee, confirmando lesões de pitiose pela demonstração de *amplicon* específico de 105 pares de bases (101).

3-3. RESULTADOS

3-3.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

A descrição literária da metodologia para infecção experimental causada por *P. insidiosum* é baseada no parasitismo do patógeno em fragmentos de grama e indução do processo de zoosporangênese em meio de indução específico. Apesar de parecer um processo simples, ele sofre influências do isolado utilizado, de sua virulência e também do tempo de manutenção em cultivo. Além da dificuldade em obter os zoósporos, a padronização da contagem dos mesmos também é um processo delicado e influencia diretamente na lesão obtida. Como se trata de

estruturas biflageladas e a contagem, realizada em Câmara de Neubauer, tem sua precisão dificultada pela movimentação dos zoósporos, não se pode afirmar a real concentração de zoósporos da solução a ser inoculada. Dessa forma, a manifestação da infecção experimental depende de muitos fatores como a quantidade de zoósporos inoculada, a resposta individual de cada animal, além da virulência do isolado utilizado, que dificulta a padronização das lesões.

Nos coelhos inoculados na região dorsal, os nódulos começaram a aparecer após 20 dias de inoculação, com rápido crescimento. Trata-se de lesões bem delimitadas, fixas, com aspecto fibroso e de consistência firme (Figura 34). Foram induzidas lesões com volume aproximado variando entre 50 e 120 cm³. Esse tipo de lesão não é o mais adequado para a avaliação da resposta fotodinâmica, uma vez que nos animais naturalmente infectados, o padrão histológico é bastante distinto com ulceração e invasão das hifas no tecido muscular. A partir de biópsia da lesão, foi realizado um novo cultivo em SDA e foi possível re-isolar o patógeno, comprovando se tratar de pitiose experimental.

Figura 34 - Aspecto macroscópico externo da lesão bem delimitada e com apalpação firme (A). Aspecto interno da lesão induzida na região das costas (B).

O modelo aqui proposto com inoculação na região tibial em membro anterior apresentou lesões com as mesmas características, aspecto fibroso e consistência firme, entretanto com menor taxa de crescimento o que facilitou o controle dos experimentos (Figura 35). Além disso, todos os coelhos inoculados desenvolveram a lesão em aproximadamente 10 dias, diferentemente da metodologia adotada

anteriormente onde aproximadamente 50% dos animais desenvolveram a lesão em o dobro do período.

Figura 35 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose experimental após 15 dias de indução na região tibial em membro anterior (A) e aspecto macroscópico da superfície de corte da lesão (B) As áreas amareladas no interior da lesão mostra a presença do micro-organismo.

3-3.2 ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de emissão de fluorescência foi utilizada para monitorar a presença dos fotossensibilizadores nas lesões experimentais no momento da irradiação, assim como o consumo destes compostos após a realização da técnica. Os espectros de fluorescência anterior e posterior à TFD utilizando Photogem[®] são apresentados na Figura 36.

Figura 36 - Espectro de emissão de fluorescência da lesão experimental de pitiose antes (em vermelho) e depois (em preto) da realização da TFD, utilizando Photogem®. A banda na região azul-verde (450-550) refere-se à fluorescência do tecido e o pico em aproximadamente 630 nm, à presença de Photogem® na lesão.

O espectro obtido antes da realização da TFD apresenta uma pequena banda com máximo em 634 nm, o qual representa a presença de baixa concentração de Photogem® na lesão. Durante a terapia, esperava-se que houvesse fotodegradação total da droga, mas isso não foi observado no espectro pós-terapia.

A Figura 37 mostra os espectros de fluorescência obtidos nos ensaios de TFD utilizando Photodithazine®.

Figura 37 - Espectro de fluorescência da lesão experimental de pitiose antes (em preto) e depois (em vermelho) da realização da TFD, utilizando Photodithazine® como agente fotossensibilizante. A banda na região do azul-verde (450-550) refere-se à fluorescência do tecido e o pico em aproximadamente 660nm à presença do Photodithazine® na lesão. Nota-se completa degradação do composto após a terapia fotodinâmica.

O espectro de emissão de fluorescência adquirido antes da TFD apresenta banda com máximo em 660nm, referente à presença de Photodithazine® na lesão. Após o tratamento, é evidenciando a fotodegradação deste fotossensibilizador. A maior concentração da droga na lesão, quando comparada ao Photogem® pode estar relacionada a uma provável afinidade do patógeno pelo fotossensibilizador utilizado. Esta afinidade é de suma importância para a eficácia da TFD e já foi demonstrada nos ensaios *in vitro* e de cinética.

Devido à baixa concentração na lesão experimental, o Photogem® foi apenas avaliado no projeto piloto e, assim, optou-se por tratar todos os animais com Photodithazine®. Portanto, as lesões e os cortes histopatológicos apresentados neste trabalho, referem-se aos animais tratados com TFD e Photodithazine®.

3-3.3 ANÁLISE DAS LESÕES

A Figura 38 mostra o aspecto macroscópico da lesão antes e após a TFD.

Figura 38 - (A) Aspectos macroscópicos da lesão experimental de pitiose antes da realização da TFD. (B) Imagem imediatamente após a aplicação da TFD com Photodithazine®. (C) Imagem 48h após a TFD. Destaque para a presença de ulceração e redução da lesão. (D) Imagem 10 dias após o tratamento com TFD. Destaque para regressão total da lesão.

Após a TFD com Photodithazine® notou-se vermelhidão na lesão em ambos os modelos de inoculação, com alteração de sua na textura, a qual se tornou menos rígida. Após 24h verificou-se redução em tamanho das lesões e ulceração na maioria delas. No modelo proposto de indução em membro anterior, dos 21 coelhos inoculados, um deles foi escolhido aleatoriamente para constituir o grupo controle, em que não houve qualquer tipo de tratamento. Após 30 dias de avaliação, realizou-se biopsias para análise histopatológica e para confirmação de pitiose através de PCR.

Dos 20 animais tratados, 19 apresentaram regressão da lesão, e um mês após não foi observada recidiva (Figura 38). Um animal apresentou lesão em tecido ósseo e não respondeu à terapia. Essa resposta era esperada devido à limitada penetração da luz. Assim, o tratamento com TFD apresentou taxa de cura de 95%.

3-3.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os animais com pitiose experimental induzida na região dorsal foram tratados após 40 dias de indução. A biópsia foi realizada 72 horas após o tratamento, a fim de verificar o efeito imediato da TFD. Os cortes histopatológicos das lesões induzidas na região dorsal do grupo controle nas colorações HE e Grocott são mostrados na Figura 39.

Figura 39 - Cortes histológicos do grupo controle. (A) Coloração HE revela infiltrado inflamatório severo com presença de fibrogranuloma envolto por células-T e fibrose. (B) Coloração de Grocott mostra hifas coradas em marrom envoltas por processo inflamatório, como esperado para pitiose (100X).

Os cortes histológicos do grupo controle revelam infiltrados inflamatórios severos e presença de fibrogranuloma, característico de pitiose. Ao redor do fibrogranuloma há células-T e fibrose, comprovada pelo arranjo irregular das fibras de colágeno. A coloração de Grocott mostra hifas em marrom envoltas por processo inflamatório, como esperado para pitiose.

A Figura 40 mostra aos cortes histopatológicos de biópsias do grupo tratado com TFD e Photodithazine®.

Figura 40 - Biópsia do grupo tratado com terapia fotodinâmica. (A) Coloração HE revela arranjo regular das células da epiderme e presença de infiltrado inflamatório na interface derme-epiderme, característico do efeito da TFD na região. (B) Coloração de Grocott mostra arranjo normal das fibras de colágeno e ausência de hifas (100X).

A biópsia do grupo tratado com TFD mostra arranjo regular das células em todas as camadas da epiderme. Na interface derme-epiderme, é possível observar presença de infiltrado inflamatório, característico do efeito da TFD na região. Vasos sanguíneos com eritrócitos, arranjo normal das fibras de colágeno e glândulas sebáceas também são mostrados. A coloração de Grocott revela arranjo normal das fibras de colágeno e ausência de hifas.

Os cortes histopatológicos do grupo controle são semelhantes aos dos animais com indução na região dorsal, apresentam severo infiltrado inflamatório e presença de fibrogranuloma. É possível observar também regiões de fibrose comprovada pelo arranjo irregular das fibras de colágeno. Além disso, há células-T ao redor do fibrogranuloma. A coloração de Grocott revela inúmeras hifas coradas em marrom envoltas por processo inflamatório (Figura 41).

Figura 41 - Cortes histológicos do grupo controle. (A) Coloração HE revela infiltrado inflamatório severo com presença de fibrogranuloma envolto por células-T e fibrose. (B) Coloração de Grocott mostra hifas coradas em marrom envoltas por processo inflamatório (100X).

Os cortes histopatológicos do grupo tratado com TFD revelam o arranjo regular das células em todas as camadas da epiderme e arranjo normal das fibras de colágeno. Glândulas sebáceas também são mostradas. A coloração de Grocott revela arranjo normal das fibras de colágeno e ausência de hifas. Neste corte, o colágeno aparece corado em coloração enegrecida (Figura 42).

Figura 42 - Biópsia do grupo tratado com terapia fotodinâmica. (A) Coloração HE revela arranjo regular das células da epiderme e das fibras de colágeno. (B) Coloração de Grocott mostra fibras de colágeno coradas em preto e ausência de hifas.

3-3.5 NESTED-PCR

A Figura 43 apresenta a quantificação da extração de DNA, PCR e Nested-PCR, confirmando a presença do patógeno na lesão.

Figura 43 - Quantificação da extração de DNA, PCR e Nested-PCR para detecção de *P. insidiosum* em lesão experimental em coelhos. 1- Low Mass Ladder (Invitrogen – 4ul); 2 – extração de DNA lesão coelho 9; 3 – extração de DNA lesão coelho 9; 4 – 100 bp Ladder (Promega – 8ul); 5 – PCR ITS1/ITS2P (outer primers); 6 – PCR ITS1/ITS2p (outer primers); 7 Controle positivo (DNA Eq-1); 8 – No; 9 – 50 bp Ladder (Fermentas – 5 ul); 10 – Nested-PCR amostra 5 PI1/PI2 (inner primers); 11 – Nested-PCR amostra 6 – PI1/PI2 (inner primers); 12 – Nested-PCR amostra 7 PI1/PI2 (inner primers); 13 – No-Nested.

3-4 DISCUSSÃO

As lesões de pitiose dos modelos experimentais são fibrogranulomatosas com aparência tumoral, bem diferente das lesões naturais, granulomatosas e ulceradas. O modelo de indução na região dorsal apresentou baixa porcentagem de desenvolvimento da doença com rápida evolução. Este fato torna difícil o tratamento com a TFD uma vez que a penetração da luz é limitada, incapaz de tratar adequadamente lesões de grandes volumes. Dessa forma, optou-se por inocular na região de membros anteriores. Aproximadamente 95% dos animais que foram induzidos desenvolveram a doença e, ao começar a desenvolver o fibrogranuloma

os animais claudicavam, fornecendo informação sobre o comportamento animal antes e depois da terapia. Foram tratadas lesões de até 16 cm² com completa regressão após única sessão de TFD. Apesar do encapsulamento característico da lesão ser um obstáculo para a penetração da luz, os parâmetros de iluminação investigados, sendo 150 mW/cm² e 200 J/cm², foram eficientes nesse estudo.

No modelo animal, os fotossensibilizadores foram administrados via endovenosa e, portanto, a cinética é bem distinta ao do estudo *in vitro* com aplicação direta dos compostos. No animal, o fotossensibilizador vai ser distribuído para todos os órgãos e tecidos, inclusive para a lesão induzida. Comparando o Photogem[®] ao Photodithazine[®], observamos uma maior distribuição e retenção deste último na lesão. Essa maior concentração do Photodithazine[®] na lesão sugere maior afinidade do composto pela lesão. Este resultado é consistente com os obtidos anteriormente nos experimentos *in vitro*, tanto nas taxas de inibição como na cinética. O Photogem[®], no tempo de incubação aqui avaliado, não se concentrou na lesão, provavelmente por não possuir afinidade com o *P. insidiosum* como observado nos experimentos de cinética *in vitro*. Em decorrência dessa situação, os animais do estudo foram tratados com o Photodithazine[®].

A análise histopatológica de ambos os modelos, lesão dorsal e no membro anterior, mostraram o alinhamento normal do colágeno após a TFD, indicando boa cicatrização do tecido. Além disso, as biópsias dos 20 animais tratados, com lesões na região da pata, mostraram ausência de hifas, indicando ausência de infecção no período de 30 dias após a terapia.

Pereira e colaboradores verificaram a susceptibilidade de 27 cepas de *P. insidiosum* à caspofungina *in vitro* e correlacionaram os resultados com a resposta terapêutica *in vivo* utilizando coelhos como modelo experimental. Os resultados obtidos mostraram que a caspofungina tem efeito fungistático limitado contra o *P. insidiosum*, uma vez que as lesões em coelhos recidivaram com a interrupção do tratamento (59). Dos 21 animais tratados com TFD, 20 não apresentaram recidiva da lesão. O único animal que apresentou recidiva mostrou uma lesão com infiltração óssea, demonstrando a limitação da terapia fotodinâmica em casos com grande invasão em profundidade. Isto foi comprovado com a análise histopatológica em que não foi observado hifas na coloração de Grocott. A terapia fotodinâmica mostrou melhores resultados em comparação com estudos descritos na literatura. Mesmo 30

dias após a realização da TFD não houve recidiva da lesão, comprovando a eficiência da técnica.

Os animais responderam adequadamente durante a terapia, assim como após a iluminação. A reação imediata observada é uma resposta inflamatória com edema e eritema, que não teve controle por medicação anti-inflamatória e apresentou resolução em até três dias. A resposta mediada foi ulceração e reabsorção do tecido danificado pela terapia. O tempo de evolução final para a reparação variou em função do volume de tecido tratado. Os animais rapidamente demonstraram melhora do quadro clínico, pois houve retorno da função do membro afetado.

A Terapia Fotodinâmica mostrou potencial para o tratamento da pitiose cutânea-subcutânea. As lesões naturais provavelmente responderão melhor à técnica uma vez que se trata de lesões ulceradas em que a penetração da luz é facilitada. Além disso, a vascularização destas lesões auxilia na difusão do fotossensibilizador e na oxigenação do tecido.

CAPÍTULO 4 – TRATAMENTO DE EQUINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Pythium insidiosum*

Os resultados promissores apresentados no modelo animal foram essenciais para motivar os primeiros ensaios clínicos em animais naturalmente infectados. Os equinos são os animais mais acometidos pela pitiose no Brasil e foram os primeiros casos realizados. Pela elevada massa corporal do animal, o volume de medicação a ser administrado via endovenosa e, portanto, sistêmica, é inviável considerando o custo do tratamento. A estratégia escolhida foi a da injeção local da clorina na lesão, buscando uma distribuição uniforme e em grande quantidade do fotossensibilizador, para maior disponibilização do fotossensibilizador para o micro-organismo.

4-1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para investigar o potencial da TFD no tratamento de lesões naturais, optou-se por realizar o tratamento em lesões de pitiose equina a partir dos protocolos estabelecidos nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Foram realizadas duas sessões em cada um dos animais a fim de verificar a resposta imediata e em curto prazo da TFD nestas lesões. Devido à ausência de qualquer dado na literatura sobre parâmetros utilizados para a TFD em equinos, foram avaliados dois compostos fotossensibilizadores com diferentes formas de administração.

Os três primeiros casos a seguir foram atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará, sob os cuidados do Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto.

4-2 CASO 1

Equino, fêmea, selvagem, proveniente da região de Castanhal. Animal em fase de amamentação com suspeita de pitiose, com lesão de aproximadamente 10 cm de diâmetro na região do boleto em membro posterior direito sem dados de tempo de evolução. A lesão foi tratada anteriormente por cauterização realizada pelo proprietário, mas sem evidências de cicatrização. Na metade esquerda foi realizada injeção intralesional de Photodithazine[®] (Photodithazine[®], Moscou, Rússia) na concentração de 5 mg/mL de modo a irrigar toda a região afetada, principalmente as bordas. Na outra metade da ferida, foi aplicado azul de metileno a 20% na forma de creme topicamente e em solução aquosa intralesional. A irradiação foi realizada com laser emitindo em 660nm (QuantumTech) acoplado a fibra óptica uniforme com intensidade de 100 mW/cm². Após a medicação iniciou-se a irradiação em áreas de 4 cm de diâmetro durante 32 minutos em cada ponto e fluência de 200 J/cm². Foram realizados pontos adicionais de modo a irradiar toda a área afetada, com ênfase nas bordas. Após a TFD observou-se enegrecimento e interrupção da exsudação (Figura 44).

Figura 44 - Lesão suspeita de pitiose equina antes do tratamento com TFD (A e B). Aplicação dos fotossensibilizadores intralesional e aplicação tópica de creme de azul de metileno a 20% (C e D). Irradiação de toda a área afetada, com ênfase das bordas. Utilizou-se fibra óptica homogênea acoplada a laser emitindo em 660nm (E e F). Aspecto da lesão após a TFD. Detalhe para o aspecto seco e escurecido após o tratamento (G-J).

Após vinte e quatro horas, foi realizada uma nova sessão de TFD. Dessa vez, utilizou-se apenas solução de azul de metileno (4%) administrado por via

intralesional por toda a lesão, com volume final injetado de 6 mL. Irradiou novamente com os mesmos parâmetros utilizados anteriormente (100 mW/cm^2 ; 200 J/cm^2) toda a lesão, com ênfase nas regiões de borda, principalmente a borda distal.

O animal permaneceu no hospital veterinário, e segundo o Prof. Dr. Diomedes Barbosa Neto, o animal evoluiu bem e atualmente, após 6 meses de terapia, apresenta-se totalmente curado da pitiose.

4-3 CASO 2

Equino, pônei, macho, proveniente da região de Castanhal-PA. Animal com lesão de pitiose de aspecto tumoral e volumoso com presença de kunkers no interior na região do jarrete do membro posterior esquerdo. Como se tratava de um animal de cor preta, a luz não penetraria no tecido, e assim não teríamos o efeito desejado, por isso optou-se por prévia ressecção cirúrgica a fim de expor o tecido infectado. O animal foi anestesiado de acordo com protocolo utilizado pelo Hospital Veterinário da UFPA por via endovenosa e em seguida iniciou-se os procedimentos de TFD. Foi realizado injeção intralesional de Photodithazine® na concentração de 5 mg/mL de modo a irrigar toda a região afetada, principalmente as bordas. Além disso, também foi injetado por via intralesional solução de azul de metileno a 4%. A irradiação foi realizada com laser emitindo em 660 nm (QuantumTech) acoplado a fibra óptica homogênea com intensidade de 100 mW/cm^2 em áreas de 4 cm de diâmetro durante 32 minutos e fluência de 200 J/cm^2 . Foram realizados 14 pontos de modo a irradiar toda a área afetada. Após a TFD notou-se redução no volume da lesão (Figura 45).

Figura 45 - Pônei com pitiose na região do jarrete em membro posterior esquerdo com presença de kunkers e exsudação característica de pitiose (A e B). (C) Injeção intralesional de fotossensibilizador. (D). Irradiação da lesão.

Vinte e quatro horas após a primeira sessão, apesar do debridamento cirúrgico, a lesão possuía aparência seca e com volume reduzido.

Outra sessão de TFD foi realizada 24 horas após a primeira, com administração intralesional de 18 mL de solução de azul de metileno a 4% de modo a irrigar toda a lesão. Os parâmetros de irradiação utilizados foram os mesmos utilizados para a primeira sessão (100 mW/cm^2 e 200 J/cm^2).

Segundo informações obtidas com o Prof. Dr. Diomedes Barbosa Neto, após a sessão de TFD observou-se melhora do aspecto granulomatoso da lesão, entretanto essa melhora foi mais lenta do que observada no caso 1. Associou-se administração intravenosa de iodeto de potássio neste animal e o mesmo foi a óbito. Provavelmente havia algum foco interno que permitiu a disseminação da doença.

A resposta superior do caso 1 era esperado devido as características da lesão. A ulceração apresentada no primeiro caso facilita a penetração da luz, assim como a difusão do fotossensibilizador por toda a lesão, aumentando a eficiência da TFD. Lesões volumosas limitam a ação da TFD, e por isso nestes casos, ressecção cirúrgica de todo o volume tumoral é indicado.

4-4 CASO 3

Equino, fêmea, vindo de haras na região Castanhal. Animal em estado de prenhez apresentando lesão na região abdominal ventral de aproximadamente 20 cm de diâmetro. A lesão era rígida e com apenas um ponto de ulceração. O animal já havia sido submetido à imunoterapia, sem sucesso. Foi realizada injeção intralesional de Photodithazine® na concentração de 5 mg/mL de modo a irrigar toda a região afetada, principalmente as bordas (Figura 46).

Figura 46 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose equina, parcialmente ulcerada, na região abdominal ventral evidenciando intensa exsudação (A-B). Aplicação intralesional do fotossensibilizador (C).

Após a administração do fotossensibilizador iniciou-se a irradiação intralesional de comprimento de 2 cm no interior de um tubo de ensaio, utilizando vários campos de irradiação, buscando as angulações permitidas pela área de ulceração. A fluência utilizada foi de 200 J/cm. Foram realizados 6 pontos intralesional e 4 pontos com iluminação superficial de 200 J/cm² (Figura 47).

Figura 47 - (A) Irradiação intralesional com fibra difusora de 2 cm. (B) Aspecto macroscópico da lesão após a primeira sessão de Terapia Fotodinâmica. (C) Detalhe do aspecto da lesão após o tratamento com alteração de textura e coloração além de drenagem. (D) Irradiação intralesional durante a segunda sessão de Terapia fotodinâmica. (E) Aspecto da lesão após a segunda sessão de TFD. Destaque para a drenagem de secreção sanguinolenta com *kunkers*. (F) Aspecto macroscópico da lesão no final do tratamento.

Após a TFD observou-se amolecimento da lesão com drenagem de solução sanguinolenta e *kunkers*. A drenagem permaneceu mesmo após o tratamento, apresentando redução na rigidez da lesão. Segundo informações obtidas recentemente com o Prof. Dr. Diomedes, este animal apresentou melhora clínica da lesão, com redução da área granulomatosa. Este animal retornou à propriedade, onde se encontra em condições ambientais favoráveis à manutenção de *P. insidiosum* no ambiente e, até o presente momento, não houve comunicação de piora do estado do animal.

4-5 CASO 4

Este caso foi atendido no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP/Jaboticabal, sob os cuidados do Prof. Delphim da Graça Maccoris.

Equino, fêmea, proveniente da região de Jaboticabal, sem histórico de banho em rio. Apresentava lesão na região do boleto em membro posterior direito com 20 cm de diâmetro, e dificuldade na função motora. Previamente realizou-se cirurgia para retirada de tecido, de forma a obter uma lesão exposta. A lesão localizava-se na região do boleto e tinha aproximadamente 20 cm de extensão (Figura 48).

Figura 48 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose equina 24h após debridamento cirúrgico. Lesão com bordas definidas, com fundo sujo, tecido necrótico, regiões amareladas com presença de *kunkers* e secreção sanguinolenta e abundante.

Utilizou-se clorina e6 solúvel em DMSO, sintetizada pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar na concentração de 5 mg/mL, como agente fotossensibilizante. Foram injetados 10 mL do composto. Após a administração do composto iniciou-se a irradiação com laser emitindo em 660nm (QuantumTech) acoplado a fibra óptica uniforme com intensidade de 90mW/cm² em área de aproximadamente 25 cm². A irradiação foi realizada por toda

a extensão da lesão com tempo de irradiação de 2000s em cada região e fluência de 200 J/cm^2 (Figura 49). Foram realizadas duas sessões de TFD, com 15 dias de intervalo.

Figura 49 - Administração intralesional de solução de clorina e6 (A) e irradiação com fibra óptica acoplada a laser emitindo em 660nm (B).

Imediatamente após a primeira sessão de TFD notou-se a interrupção da exsudação da secreção característica de pitiose, entretanto a lesão apresentou drenagem de líquido incolor. Além disso, foi observado mudança no aspecto da área tratada, tornando a região mais enegrecida e seca em relação à região não tratada (Figura 50).

Figura 50 - Lesão antes da TFD com exsudação característica de pitiose equina (A) e após a TFD com aparência seca (B).

Cinco dias após a primeira aplicação já não havia exsudação e o tecido apresentava início do processo de cicatrização (Figura 51). Além disso, o animal recuperou parte da função motora que estava comprometida.

Figura 51 - Aspecto macroscópico da lesão de pitiose equina cinco dias após a realização de uma sessão de TFD. Lesão com bordas definidas, com tecido de granulação, sem evidências de tecido necrótico nem regiões com *kunkers*.

Após 15 dias, a lesão apresentou recidivas em algumas regiões (Figura 52).

Figura 52 - Aspecto macroscópico da lesão 15 dias após a realização da TFD. Lesão em processo de cicatrização na região central e posterior (D), e bordas com presença de *kunkers*, indicando recidiva da lesão (A, B, C).

Figura 53 - Aspecto imediatamente após a segunda sessão de TFD. Lesão em processo de cicatrização nas regiões central e posterior, desprendimento de *kunkers* das bordas e aparência necrótica.

Cinco dias após a segunda sessão de TFD era notável o processo cicatricial do tecido e ausência de *kunkers* (Figura 54). Após os tratamentos foi diagnosticada metástase na região mamária do animal e por isso a TFD foi interrompida. O animal foi mantido no HV por mais duas semanas com melhora na função motora e ausência de recidivas na região do boleto.

Figura 54 - Aspecto da lesão cinco dias após a Terapia Fotodinâmica. Lesão em processo de cicatrização das regiões centrais e de bordas (re-epitelização), ausência de *kunkers* e necrose.

As recidivas foram observadas nas regiões das bordas distal e medial. Como se tratava de uma lesão muito extensa injetou-se fotossensibilizador na borda externa e na região posterior e iniciou a irradiação. Após este procedimento, injetou-se fotossensibilizador na borda lateral interna e iniciou a irradiação em seguida. A única região que além de não recidivar, apresentou re-epitelização foi a região posterior. O tempo entre a injeção do fotossensibilizador nesta área e o início da irradiação foi de aproximadamente 2 horas, sendo este tempo favorável, uma vez que tempo superior a uma hora de incubação é favorável para a TFD com clorina e6, conforme já demonstrado nos estudos *in vitro* e de cinética. Este fato pode explicar a melhor resposta obtida em regiões diferentes da mesma lesão, e reforça a necessidade de maiores tempos de incubação para aumentar a efetividade da TFD.

No início do tratamento se observou uma lesão abdominal que já poderia significar outro sítio acometido por disseminação linfática, entretanto foi diagnosticada como mastite. Com a evolução da lesão nesta região, o quadro de metástase de pitiose foi diagnosticado. O tratamento foi então interrompido devido ao acometimento linfático e o animal retornou para a proprietária. Apesar do óbito devido às complicações linfáticas, não foi observado recidiva da lesão na região de membro tratado.

4-6 DISCUSSÃO

As lesões de pitiose equina mais ulceradas e superficiais mostraram melhor resposta fotodinâmica quando comparadas às lesões com aspecto tumoral. Este fato é justificado pela limitação da penetração do fotossensibilizador e da luz. A vascularização da lesão também influencia diretamente na resposta tecidual frente à técnica uma vez que facilita a difusão do oxigênio por todo o tecido. Nos animais aqui avaliados foram realizadas apenas duas sessões de TFD e mostraram resultados promissores. Devido à extensão da lesão, a irradiação ocorreu por tempo prolongado uma vez que foi realizada com feixe luminoso de quatro cm de diâmetro. Um equipamento constituído de LEDs com maior área de irradiação seria o ideal para a realização da terapia.

Ao comparar a clorina comercial, Photodithazine[®], com a clorina e6 solúvel em DMSO foi observado maior efetividade desta última. Este fato pode ser explicado pela facilidade de difusão do DMSO no tecido. Além disso, a clorina e6 foi purificada após sua síntese e, o princípio ativo representa toda a concentração da solução. Com o Photodithazine[®], por não ser purificado, o princípio ativo representa apenas 60% da solução. Outro fato que pode explicar essa melhor resposta frente à terapia é o tempo de incubação. A lesão tratada com clorina e6 era muito extensa, assim o período entre a administração do composto e o início da irradiação foi superior a uma hora em algumas áreas. Estas regiões coincidem com as áreas de re-epitelização e cicatrização tecidual. Esta hipótese é validada pelos ensaios de *in vitro* de cinética.

A TFD pode ser potencializada com a administração endovenosa regional do fotossensibilizador, com auxílio de garrote. Essa forma de administração provavelmente distribuirá de forma mais homogênea o composto no tecido. A desvantagem é que para a realização deste procedimento é necessário anestesiá-lo animal e, por isso, o tempo de irradiação deve ser limitado a 40 minutos, no máximo. Isto seria possível com a utilização de equipamento a base de LEDs com irradiação de toda a lesão.

A utilização de composto fotossensível com absorção no início do infravermelho também pode aperfeiçoar a técnica, uma vez que nesta faixa de comprimento de onda a penetração da luz no tecido é maior. Assim, com uma única sessão seria possível tratar lesões mais profundas. Para lesões muito volumosas a indicação de ressecção cirúrgica prévia é necessária. Apesar da limitação em profundidade, a TFD apresenta vantagens em relação à cirurgia e à imunoterapia como não depender de alguns fatores relacionados ao estado nutricional do animal, à localização e extensão da lesão, ao sistema imunológico e, principalmente, à espécie afetada. Além disso, não há restrições quanto ao número de sessões realizadas, pois se trata de um método terapêutico de ação local.

O tamanho da lesão, especialmente considerando sua espessura, foi o fator mais importante para o sucesso ou insucesso da TFD nos cavalos tratados. Assim como no estudo no modelo animal, a resposta ao tratamento somente foi completa nas lesões de menor espessura. O uso de sessões múltiplas talvez pudesse ter resultado na resposta completa, no entanto, isso não foi possível no presente estudo, em decorrência de limitações logísticas de transporte e tempo.

Os casos clínicos realizados em cavalos confirmaram os resultados observados em coelhos e nos experimentos *in vitro*: para o tratamento da pitiose são necessárias altas fluências, utilização das clorinas como agentes fotossensibilizadores, e períodos de incubação superiores a uma hora. A TFD mostrou grande potencial no tratamento de pitiose equina.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

As taxas de inibição no crescimento *in vitro* de *P. insidiosum* submetidos à TFD com Photodithazine® mostraram-se superiores a 80% para todos os parâmetros aqui avaliados após uma única sessão de TFD. Os melhores resultados foram obtidos para a maior fluência investigada (70 J/cm²) independente da concentração do composto, o que indica uma maior dependência da fluência em relação à concentração do composto. Para o Photogem®, as altas concentrações não foram efetivas para a inativação do patógeno, possivelmente devido à agregação das moléculas. O azul de metileno não foi eficiente na inativação do micro-organismo. Os resultados obtidos para a TFD foram superiores aos da Anfotericina B, mostrando potencial da técnica na inativação do *P. insidiosum*.

A afinidade dos compostos com o micro-organismo em estudo é de fundamental importância para a eficiência da TFD. O estudo da cinética mostrou diferentes comportamentos para cada uma das classes de compostos avaliadas. As clorinas mostraram grande afinidade e penetração na célula microbiana. Com apenas 10 minutos de imersão, os compostos penetraram e se concentraram em estruturas intracelulares específicas. Essas estruturas podem estar relacionadas aos vacúolos de corpo denso, organelas com alto estoque de açúcares. Provavelmente essas estruturas também foram marcadas pela safranina, indicando alta concentração de celulose. Como as clorinas são derivadas de clorofila, pode haver uma afinidade com a celulose, permitindo fácil penetração no interior da hifa e localização em estrutura com estoque de polissacarídeos. A rápida penetração das clorinas na célula microbiana também pode ser explicada por sua carga negativa em meio biológico, sendo facilmente atraída por membranas. Analisando a estrutura química, as clorinas não seriam capazes de se ligar aos vacúolos de corpo denso devido a semelhança de suas cargas. Estudos com marcadores moleculares são necessários para determinar estas estruturas específicas. Quando a TFD foi realizada nos menores tempos de incubação, o composto se concentrou apenas nessas estruturas intracelulares e foram observadas hifas ainda cilíndricas, mas com ausência de fluorescência em diversos pontos, referentes a essas estruturas. Possivelmente o efeito ocorreu no meio intracelular e não afetou a parede e

membranas celular. Ainda assim, após cultivo as hifas não apresentaram crescimento. Nesse caso, o efeito fotodinâmico ocorreu em estruturas intracelulares, inviabilizando o crescimento microbiano, sem afetar sua parede celular e componentes de estruturação da célula. Para maiores tempos de incubação, em que o composto distribuiu-se por toda a célula, inclusive na parede celular, houve rompimento da estrutura e extravasamento de material amorfo. Este fato sugere que maiores tempos de incubação podem tornar a TFD ainda mais eficaz, pois com a distribuição mais difusa do fotossensibilizador, um maior número de estruturas celulares é alvo da terapia.

O Photogem[®] apresentou um tempo mais elevado para a localização em parede celular e penetração no interior da hifa. Entretanto, o maior problema observado foi a distribuição heterogênea entre as células microbianas, independente do tempo de incubação do composto. Este fato pode explicar o motivo de algumas hifas retomarem crescimento após a TFD. Apesar de observarmos morte celular, muitas hifas permanecem intactas. Este resultado é importante uma vez que se após o tratamento com TFD alguma hifa permanecer ativa, certamente a lesão recidivará. Dessa forma, Photogem[®] não é o tipo de fotossensibilizador mais indicado para a inativação do *P. insidiosum*.

O azul de metileno tem sido descrito como um dos melhores fotossensibilizadores para a inativação de micro-organismos. Entretanto, não foi observada uma ação antimicrobiana efetiva para o *P. insidiosum*. Isto pode ser compreendido quando se observou que este composto não penetrou na célula microbiana e ainda, não mostrou eficiência para a inativação do *P. indisiosum*. observado por microscopia confocal, onde foi possível verificar a integridade das hifas após tratamento com TFD. Dessa forma, o azul de metileno também não deve ser o fotossensibilizador de escolha para a inativação do patógeno.

Os estudos no modelo experimental de pitiose confirmaram os resultados obtidos anteriormente nos ensaios *in vitro*. Através da espectroscopia de fluorescência verificou-se que apenas o Photodithazine[®] localizou-se na lesão. Além disso, concluiu-se também que devido a características morfológicas da lesão, altas intensidades e fluências foram necessárias. Com o protocolo de administração intravenosa de Photodithazine[®] na concentração de 1,0 mg/kg, intensidade luminosa de 150 mW/cm² e fluência de 200 J/cm², 95% dos animais tratados apresentaram regressão da lesão e ausência de hifas nos cortes histopatológicos, indicando cura.

A histopatologia também mostrou ausência de processo inflamatório nos animais tratados e ausência de fibrogranuloma. Além disso, após única sessão de TFD os animais recuperaram a função motora do membro afetado.

Nos equinos naturalmente infectados com *P. insidiosum*, os resultados também foram promissores. Avaliaram-se diversos protocolos a fim de verificar, além da inativação microbiana, a resposta tecidual. O Photodithazine® apresentou resultados bastante satisfatórios, com desprendimento de kunkers e melhora da condição tecidual, sendo observada a re-epitelização em algumas bordas das feridas, indicativo de resolução da infecção e de processo de reparação. O animal tratado com clorina e6 solúvel em DMSO apresentou o melhor resultado, com presença de regiões de re-epitelização e ausência de recidiva por 15 dias após a última sessão. Com os resultados da cinética, se faz necessário reavaliar a resposta em lesões de pitiose experimental, uma vez que o fotossensibilizador foi administrado e imediatamente após iniciou-se a irradiação. Talvez, melhores resultados possam ser obtidos para maiores tempos de incubação. Uma evidência disso, é que no caso 4, por ser uma lesão extensa na região posterior, o composto ficou incubado por mais de duas horas não havendo recidiva na região, com o processo de cicatrização mais acelerado.

Baseado nos resultados dos estudos, atualmente, indicariamos um protocolo de TFD para o tratamento da pitiose com utilização de clorinas, tempo de incubação superior a uma hora, irradiância entre 80-150 mW/cm² e fluência ao redor de 200 J/cm². Parâmetros que ainda devem ser esclarecidos são, tipo de administração do fotossensibilizador, sendo injeção intralesional ou sistêmica, intervalo do tempo de incubação, regimes de intensidade acima de 150 mW/cm², resposta fotodinâmica empregando irradiação pulsada e de múltiplas sessões. A TFD provavelmente será mais efetiva para o tratamento de outras espécies como cães e humanos, uma vez que as lesões de pitiose nestas espécies são mais superficiais quando comparada às de equinos.

Novos estudos em lesões naturalmente infectadas de pitiose são necessários, entretanto este trabalho traz evidências fortes sobre o potencial da TFD para o tratamento da pitiose.

5-1 CONCLUSÕES

Os ensaios *in vitro*, de cinética e de terapia fotodinâmica em microscopia confocal, assim como os ensaios em modelo experimental *in vivo* e o tratamento de lesões de cavalos naturalmente infectados evidenciam a afinidade das clorinas pelo *P. insidiosum*, posicionando esta classe de composto como a de escolha atual para a inativação deste patógeno, inclusive no tratamento do tecido infectado. O protocolo deve ser baseado na combinação clorinas, tempos de incubação superiores a uma hora e altas irradiância e fluência. Os estudos realizados neste trabalho revelam o potencial da TFD na inativação do *P. insidiosum* assim como no tratamento da pitiose.

REFERÊNCIAS

- 1 PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis. *Emerging infectious diseases*, v. 12, n. 3, p. 517-518, 2006.
- 2 RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, n. 3, p. 262-269, 2005.
- 3 PEREZ, R. C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. *Veterinary Microbiology*, v. 109, n. 1-2, p. 121-128, 2005.
- 4 SANTURIO, J. M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosi in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia*, v. 141, n. 3, p. 123-125, 1998.
- 5 VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). *Medical Mycology*, v. 50, n. 2, p. 219-224, 2012.
- 6 BERRYESSA, N. A. et al. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, n. 4, p. 1065-1069, 2008.
- 7 PESAVENTO, P. A. et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. *Veterinary Pathology*, v. 45, n. 4, p. 538-541, 2008.
- 8 KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 5, p. 569-576, 2006.
- 9 SALLIS, E. S. V.; PEREIRA, D. I. B.; RAFFI, M. B. Pitiose cutânea em eqüinos: 14 casos. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, p. 899-903, 2003.
- 10 LEAL, A. B. M. et al. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n. 4, p. 151-156, 2001.
- 11 BEZERRA JÚNIOR, P. S. et al. Pitiose intestinal em equino no Sul do Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 2, p. 481-483, 2010.
- 12 SANTOS, C. E. P. et al. Contribuição ao estudo da pitiose cutânea em equídeos do pantanal norte, Brasil. *ARS Veterinária*, v. 27, n. 3, p. 134-140, 2011.

13 SANTOS, C. E. P. et al. Eficácia da imunoterapia no tratamento de pitiose facial em equino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 39, n. 1, 2011. Disponível em: <http://www.pitiose.com.br/dods/eficacia_da_imunoterapia_no_tratamento_de_pitios_e_facial_em_equino.pdf>. Acesso em: 15 jan 2012.

14 HEADLEY, S. A. Equine cutaneous pythiosis: a report of four cases. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 289-292, 2004.

15 SANTOS, C. E. P.; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Pitiose em animais de produção no pantanal matogrossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 12, p. 1083-1089, 2011.

16 PEREIRA, D. I. et al. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. *Veterinary Research Communications*, v. 34, n. 3, p. 301-306, 2010.

17 BOSCO, S. M. G. et al. Human pythiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.

18 NETO, R. T. et al. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. *Veterinary Dermatology*, v. 21, n. 2, p. 202-204, 2010.

19 TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. *Veterinary Pathology*, v. 41, n. 4, p. 412-415, 2004.

20 MEIRELES, M. C. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses*, v. 36, n. 3-4, p. 139-142, 1993.

21 REIS JUNIOR, J. L. et al. Disseminated pythiosis in three horses. *Veterinary Microbiology*, v. 96, n. 3, p. 289-295, 2003.

22 SANTURIO, J. M. C. et al. Tratamento imunoterápico da pitiose eqüina. comunicado técnico. Disponível em: <www.cnpq.embrapa.br/publicacoes/cot/COT67.html>. Acesso em: 05 out 2011.

23 MENDOZA, L.; HERNANDEZ, 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, 1993.

24 HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 4, n. 3, p. 283-293, 2005.

- 25 DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiological Research*, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.
- 26 DONNELLY, R. F. et al. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 86, n. 1, p. 59-69, 2007.
- 27 BOCKSTAHLER, L. E.; LYTLE, C. D.; HELLMAN, K. B. A review of photodynamic therapy for herpes simplex: benefits and potential risks. *The New York Journal of Dentistry*, v. 45, n. 5, p. 148-157, 1975.
- 28 BEDWELL, J. et al. In vitro killing of *Helicobacter pylori* with photodynamic therapy. *Lancet*, v. 335, n. 8700, p. 1287, 1990.
- 29 CAPELLA, M. A.; MENEZES, S. Synergism between electrolysis and methylene blue photodynamic action in *Escherichia coli*. *International Journal of Radiation Biology*, v. 62, n. 3, p. 321-326, 1992.
- 30 NITZAN, Y. et al. Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, v. 62, n. 2, p. 342-347, 1995.
- 31 SZPAKOWSKA, M. et al. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to a photodynamic effect of the arginine hematoporphyrin derivative. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 8, n. 1, p. 23-27, 1997.
- 32 ASILIAN, A.; DAVAMI, M. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 31, n. 5, p. 634-637, 2006.
- 33 SMIJS, T. G.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Photochemistry and Photobiology*, v. 77, n. 5, p. 556-560, 2003.
- 34 CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2005.
- 35 ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1996. 865 p.

- 36 POWELL M J, BRACKER C E. Isolation of zoospore organelles from *Phytophthora palmivora*. In: INTERNATIONAL MYCOLOGY CONGRESS, 2, 1977, Amherst. *Anais ...* Amherst, MA: Hamilton Newell Inc, 1977.
- 37 GARCIA, R. B.; PASTOR, A.; MENDOZA, L. Mapping of *Pythium insidiosum* hyphal antigens and ultrastructural features using TEM. *Mycological Research*, v. 111, n. 11, p. 1352-1360, 2007.
- 38 MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. *Mycopathologia*, v. 104, n. 1, p. 59-62, 1988.
- 39 SHIPTON, W. A. Regulation by ions of zoospore release in *Pythium*. *Australian Journal of Botany*, v. 35, n. 1, p. 10, 1987.
- 40 PEREIRA, D. I. B. et al. In vitro zoosporogenesis among oomycetes *Pythium insidiosum* isolates. *Ciência Rural*, v. 38, n. 1, p. 4, 2008.
- 41 CARVALHO, E. C. Q.; LEMOS, L. S.; REIS JUNIOR, J. L. Pitiose eqüina: o popular formigueiro da baixada campista. *Boletim Técnico UENF.*, v. 1, 2000. 48p.
- 42 GUEDES, R. M. C.; ZICA, K. G. B.; NOGUEIRA, R. H. G. Ficomicose e habronemose cutânea. Estudo retrospectivo de casos diagnosticados no período de 1979 a 1996. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 50, n. 4, p.465-468, 1998.
- 43 HEADLEY, S. A.; ARRUDA JUNIOR, H. N. Cutaneous pythiosis in a slaughtered horse: a case report. *Ciência Rural*, v. 69, n. 1, p. 289-292, 2002.
- 44 MARQUES S. A. et al. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humano no Brasil. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 81, n. 5, p. 483-485, 2006.
- 45 MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. *Mycopathologia*, v. 94, n. 2, p. 123-129, 1986.
- 46 MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. *Mycopathologia*, v. 119, n. 2, p. 89-95, 1992.
- 47 MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. *Australian veterinary journal*, v. 57, n. 8, p. 377-382, 1981.

48 GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Veterinary Microbiology*, v. 146, n. 1-2, p. 1-16, 2010.

49 MCMULLAN, W. C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 170, n. 11, p. 1293-1298, 1977.

50 MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. Clinical observations on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal*, v. 58, n. 6, p. 221-226, 1982.

51 MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine*, v. 21, n. 21-22, p. 2797-2804, 2003.

52 DYKSTRA, M. J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. *Medical Mycology*, v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.

53 CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 201, n. 2, p. 310-312, 1992.

54 ALLISON, N.; GILLIS, J. P. Enteric pythiosis in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 196, n. 3, p. 462-464, 1990.

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

56 SEKHON, A. S.; PADHYE, A. A.; GARG, A. K. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffe* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. *European Journal of Epidemiology*, v. 8, n. 3, p. 427-432, 1992.

57 TRISCOTT, J. A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.

58 ARGENTA, J. S. et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 2, p. 767-769, 2008.

59 PEREIRA, D. I. et al. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, n. 5, p. 1168-1171, 2007.

- 60 MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. Experimental pythiosis in rabbits. *Sabouraudia*, v. 21, n. 4, p. 331-341, 1983.
- 61 ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- 62 ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics*, v. 35, n. 7, p. 3127-3136, 2008.
- 63 ZHU, Z. et al. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 33, p. 10856-10857, 2008.
- 64 BERTOLONI, G. et al. Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of microbial cells. *Photochemistry and Photobiology*, v. 46, n. 5, p. 695-698, 1987.
- 65 MAISCH, T. et al. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, v. 9, n. 5, p. 360-366.
- 66 ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge. *The New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 5, p. 439-443, 2009.
- 67 PEREIRA GONZALES, F.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biology*, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2012.
- 68 SOUZA, S. C. et al. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 83, n. 1, p. 5, 2006.
- 69 LYON, J. P. et al. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, v. 172, n. 4, p. 293-297, 2011.
- 70 GONZALES, F. P. et al. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. *Photochemistry and Photobiology*, v. 86, n. 3, p. 653-661, 2010.
- 71 ZEINA, B. et al. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *The British Journal of Dermatology*, v. 144, n. 2, p. 274-278, 2001.

72 ITO, T. Photodynamic action of hematoporphyrin on yeast cells--a kinetic approach. *Photochemistry and Photobiology*, v. 34, n. 4, p. 521-524, 1981.

73 BLISS, J. M. et al. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 6, p. 2000-2006, 2004.

74 BERTOLONI, G. et al. Biochemical and morphological changes in *Escherichia coli* irradiated by coherent and non-coherent 632.8 nm light. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 18, n. 2-3, p. 191-196, 1993.

75 MANG, T. S.; MIKULSKI, L.; HALL, R. E. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, n. 2, p. 98-105, 2010.

76 DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005.

77 PARK, J. H. et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers in Medical Science*, v. 25, n. 5, p. 705-710, 2010.

78 EICK, S.; PFISTER, W. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *Journal of Periodontology*, v. 75, n. 10, p. 1327-1334, 2004.

79 DOVIGO, L. N. et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 43, n. 9, p. 927-934, 2011.

80 PEREIRA, C. A. et al. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers in Medical Science*, v. 26, n. 3, p. 341-348, 2011.

81 SCHNEIDER, M. et al. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers in Medical Science*, v. 27, n. 3, p. 615-620, 2011.

82 RIBEIRO, D. G. et al. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. Photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers in Medical Science*, v. 27, n. 1, p. 161-168, 2011.

83 BONNETT, R. et al. Porphyrin sensitizers in tumour phototherapy. Novel sensitizers of the chlorin and bacteriochlorin class with amphiphilic properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 6, n. 1-2, p. 29-37, 1990.

84 DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.

85 LEE, W. J. et al. Effect of photodynamic therapy on inflammatory acne using 3% liposomal 5-aminolevulinic acid emulsion and intense-pulsed light: A pilot study. *The Journal of Dermatology*, v. 39, n. 1, p. 1-2, 2012.

86 YANG, Y. et al. A refractory case of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* with improvement by photodynamic therapy. *Medical Mycology*, p. 1-5, 2012. DOI: 10.3109/13693786.2012.655258.

87 CALZAVARA-PINTON, P. et al. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 88, n. 3, p. 512-522, 2012.

88 LIU, A. et al. Pulsed dye laser and pulsed dye laser-mediated photodynamic therapy in the treatment of dermatologic disorders. *Dermatologic Surgery*, v. 38, n. 3, p. 351-366, 2012.

89 KARU, T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 3, n. 4, p. 638-640, 1989.

90 BOND, J. et al. Safranin fluorescent staining of wood cell walls. *Biotechnic & histochemistry*, v. 83, n. 3, p. 161-171, 2008.

91 TEGOS, G. et al. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 10, p. 3133-3141, 2002.

92 SHENEP, J. L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

93 CAVALHEIRO, A. S. et al. In Vitro activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 5, p. 2136-2138, 2009.

94 CAVALHEIRO, A. S. et al. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Veterinary Microbiology*, v. 137, n. 3-4, p. 408-411, 2009.

- 95 SCHURKO, A. M. et al. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycological Research*, v. 107, n. 5, p. 537-544, 2003.
- 96 LORETO, E. S. et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 7, p. 3588-3590, 2011.
- 97 STRAKHOVSKAYA, M.G. et al. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, v. 384, n. 1-6, p. 155-158, 2002.
- 98 PASYECHNIKOVA, N.; ZBOROVSKAYA, O.; KUSTRIN, T. In vitro photodynamic properties of methylene blue in a combination with laser illumination at 630 nm concerning *Candida albicans*. *Klinika Oczna*, v. 111, n. 1-3, p. 15-17, 2009.
- 99 JACKSON, Z. M. et al. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers in Medical Science*, v. 14, n. 2, p. 150-157, 1999.
- 100 WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.
- 101 GROOTERS, A.M.; GEE, M.K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 16, n. 2, p. 147-152, 2002.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal para os estudos de infecção experimental de pitiose.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 207-CEEA, sobre “Terapia Fotodinâmica em Infecção Experimental em Coelhos para o Tratamento de Lesões Cutâneas e Subcutâneas Causadas por *Pythium insidiosum*”, sob a responsabilidade de **Sandra de Moraes Gimenes Bosco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “*ad referendum*” da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**, nesta data.

Botucatu, 28 de maio de 2010.

Profª Drª PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO
Presidente - CEEA

Instituto de Biociências – Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6013/8014 fax 14 3815 3744 e-mail: dia@ibb.unesp.br

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal para o tratamento de pitiose equina.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **186-CEEA**, sobre “Avaliação da Terapia Fotodinâmica para Tratamento de Lesões Cutâneas e Subcutâneas de Pitiose Equina”, sob a responsabilidade de **Sandra de Moraes Gimenes Bosco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), nesta data.

Botucatu, 04 de dezembro de 2009.

Prof.ª Dra. **PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO**
Presidente - CEEA