



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANA GECICA SOUZA NUNES

Avaliação do efeito *in vitro* da terapia fotodinâmica sobre o crescimento do *Pythium insidiosum* equino

ILHÉUS - BA

2025

ANA GECICA SOUZA NUNES

Avaliação do efeito *in vitro* da terapia fotodinâmica sobre o crescimento do *Pythium insidiosum* equino

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Clínica e Sanidade Animal

Sub-área: Biotecnologia e experimentação animal

Orientadora: Fabiana Lessa Silva

Coorientadora: Maria Amélia Fernandes Figueiredo

ILHÉUS - BA

2025

ANA GECICA SOUZA NUNES

Avaliação do efeito in vitro da terapia fotodinâmica sobre o crescimento do *Pythium insidiosum* equino

Ilhéus - BA, 30/04/2025

Fabiana Lessa Silva – Professora Plena

UESC/DCAA

(Orientadora)

Fernando Alzamora Filho – Professor Pleno

UESC/DCAA

Lucas José Luduverio Pizauro – Professor Assistente

UESC/DCAA

ILHÉUS - BA

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por ter me sustentado e guiado até aqui.

À minha mãe, Gecineide, por nunca duvidar da minha capacidade e competência. Obrigada por todo amor e apoio incondicional.

Ao meu namorado, Felipe, agradeço por todo companheirismo, amor e suporte para que eu pudesse me dedicar e concluir mais essa etapa.

Aos meus amigos e familiares que entenderam as ausências em datas e eventos importantes. Muito obrigada por sempre torcerem por mim.

À prof^a. Fabiana Lessa por me aceitar como sua orientada e acreditar no meu trabalho. Muito obrigada por me ensinar e direcionar pelos caminhos da pesquisa.

À prof^a. Maria Amélia, minha coorientadora, agradeço pelas direções e trocas de sempre sobre a clínica de equídeos, levantando a importância sobre o tema para desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Lucas Pizauro, agradeço por toda paciência e calma para me passar ensinamentos sobre a microbiologia, permitindo todo o desenvolvimento e execução do projeto.

Ao prof. Fernando Alzamora, agradeço por todos os ensinamentos sobre terapia fotodinâmica e auxílio no desenvolvimento de metodologia do projeto.

As professoras Mônica Mattos (UFBA) e Daniela Brayer (UFPEL), e a Dr^a. Ana Carolina agradeço por terem elucidado várias dúvidas e possibilitado o desenvolvimento e conclusão do projeto sobre o Pythium.

Aos meus colegas de mestrado, principalmente Stefany e Iuri, obrigada por todo amparo nos momentos de incertezas e todas as conversas sobre a vida.

Agradeço também aos técnicos dos laboratórios, Fabi e Ivo, além dos vigias e profissionais dos serviços gerais por viabilizarem e facilitarem o meu trabalho.

Aos cavalos que participaram desse projeto, agradeço por permitirem o aprendizado e aprimoramento das técnicas empregadas aqui.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

Avaliação do efeito *in vitro* da terapia fotodinâmica sobre o crescimento do *Pythium insidiosum* equino

RESUMO

A pitiose é uma doença infecciosa que afeta mamíferos e pássaros, sendo os equinos acometidos mais frequentemente, e o Brasil apresenta a maior incidência da doença nessa espécie. A enfermidade é causada principalmente pelo oomiceto *Pythium insidiosum* e apresenta rápida evolução, sendo potencialmente fatal. A resolução das lesões depende da região anatômica afetada, do período de evolução e, principalmente, do tratamento escolhido, uma vez que a resposta do agente etiológico aos tratamentos antifúngicos e antimicrobianos convencionais não apresenta bons resultados devido à ausência do ergosterol em sua parede celular, sendo este o principal sítio de ação das drogas antifúngicas. O objetivo desse estudo foi avaliar a susceptibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* frente à terapia fotodinâmica antimicrobiana. Os ensaios de inibição foram realizados utilizando três isolados obtidos a partir da rotina clínica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (Uesc). A metodologia utilizada consistiu na aplicação dos tratamentos sobre cortes padronizados do raio de crescimento de culturas previamente preparadas. Foram investigadas as concentrações de 0,01, 0,03, 0,5 e 1% de curcumina diluídas em DMSO 10% e, para efeito comparativo, também foram testadas as concentrações 25, 50 e 100µL/mL de anfotericina B preparadas em solução fisiológica a 0,9%. A partir das avaliações estatísticas realizadas pela medição do crescimento radial comparando os grupos tratados e controle, sugere-se o potencial inibitório da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre o crescimento de *Pythium insidiosum*.

Palavras-chave: curcumina; pitiose; terapia fotodinâmica; tratamento.

**Evaluation of the in vitro effect of photodynamic therapy on the growth of equine
*Pythium insidiosum***

ABSTRACT

Pythiosis is an infectious disease that affects mammals and birds, with horses being the most frequently affected species. Brazil has the highest incidence of the disease in this species. The illness is mainly caused by the oomycete *Pythium insidiosum* and progresses rapidly, being potentially fatal. The resolution of the lesions depends on the anatomical region affected, the duration of disease progression, and especially the treatment chosen, since the etiological agent shows poor response to conventional antifungal and antimicrobial therapies. This is due to the absence of ergosterol in its cell wall, which is the primary target site for antifungal drugs. The aim of this study was to evaluate the in vitro susceptibility of *P. insidiosum* isolates to antimicrobial photodynamic therapy. Inhibition assays were conducted using three isolates obtained from the clinical routine of the Veterinary Hospital at the State University of Santa Cruz (Uesc). The methodology used consisted of applying the treatments on standardized sections of the growth radius of previously prepared cultures. Curcumin concentrations of 0.01%, 0.03%, 0.5%, and 1% diluted in 10% DMSO were investigated. For comparison purposes, amphotericin B was also tested at concentrations of 25, 50, and 100 µL/mL prepared in 0.9% saline solution. Based on statistical analyses measuring radial growth and comparing treated and control groups, the antimicrobial photodynamic therapy demonstrated inhibitory potential against the growth of *Pythium insidiosum*.

Keywords: curcumin; photodynamic therapy; pythiosis; treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Aspecto macroscópico de colônia de *P. insidiosum* cultivada por 5 dias (A). Visão macroscópica do padrão de septação esparsa das hifas do *P. insidiosum* coradas com Azul de Lactofenol (B). Fonte: Gaastra et al., 2010 (Adaptado) 14
- Figura 2** – Aspecto macroscópico de lesão cutânea em equino com pitiose na região do abdômen. Fonte: Pires, 2012 (Adaptado) 16
- Figura 3** – “Kunkers” coletados de equino com pitiose cutânea. Fonte: Gaastra et al., 2010 (Adaptado) 17
- Figura 4** – Potro atendido no Hospital Veterinário da Uesc com lesão sugestiva de pitiose .. 22
- Figura 5** – “Kunkers” obtidos de tecido lesionado após excisão cirúrgica 23
- Figura 6** – Lavagem sequencial dos “Kunkers” coletados de lesões de equinos atendidas no Hospital Veterinário da Uesc 23
- Figura 7** – Fragmentos de “kunkers” semeados em placa de Petri contendo meio Sabouraud com Clorafenicol 24
- Figura 8** – Diagrama demonstrando o teste de inibição realizado com as diferentes concentrações de Anfotericina B sobre o crescimento do *P. insidiosum* 25
- Figura 9** – Diagrama demonstrando o teste de citotoxicidade da curcumina a 1% e grupo controle com DMSO a 10% sobre o crescimento do *P. insidiosum* 26
- Figura 10** – Diagrama demonstrando o teste com aplicação da luz e controle sem aplicação da luz sobre os fragmentos de cultura do *P. insidiosum* 27
- Figura 11** – Diagrama demonstrativo do teste de inibição da terapia fotodinâmica sobre o crescimento do *P. insidiosum* 27
- Figura 12** – Demonstração do método de aplicação do led azul. (A) Vista superior externa com a caixa aberta. (B) Vista superior interna. (C) Vista frontal interna com caixa fechada 28
- Figura 13** – Imagem representativa da utilização do software para obtenção da medida da área das colônias 29
- Figura 14** – Box plot demonstrando a Área (cm²) do crescimento radial comparativo entre os tratamentos com Anfotericina B a 100 µL, 25 µL e 50 µL com o grupo controle tratado com Solução fisiológica. Parâmetros identificados com * apresentam diferença estatística do controle identificado com + (p < 0,05) 31
- Figura 15** – Gráfico de barras demonstrando a Área (cm²) do crescimento radial comparativo entre os fragmentos tratados com 50J/cm² de led azul o grupo controle, sem aplicação de luz. Parâmetros identificados com * apresentam diferença estatística do controle identificado com + (p < 0,05) 32
- Figura 16** – Comparação entre as colônias do *P. insidiosum* do grupo tratado com curcumina 1% com irradiação de luz azul por vinte segundos (1) e o grupo controle (2) apenas com DMSO 10%. A, B e C representam as idades das colônias às 24, 48 e 168 horas, respectivamente 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempos aplicados e suas respectivas energia e densidade energética	28
Tabela 2 – Média \pm DP da área de crescimento das colônias (cm ²) de <i>Pythium insidiosum</i> após tratamento com diferentes concentrações de Anfotericina B e grupo controle (solução fisiológica)	31
Tabela 3 – Média \pm DP da área de crescimento das colônias (cm ²) de <i>Pythium insidiosum</i> após tratamento com a curcumina a 1% e grupo controle com DMSO 10%	32
Tabela 4 – Média \pm DP da área de crescimento das colônias (cm ²) de <i>Pythium insidiosum</i> após tratamento com led azul na fluência de 50J/cm ² e grupo controle sem luz	33
Tabela 5 – Média \pm DP da área de crescimento das colônias (cm ²) de <i>Pythium insidiosum</i> após tratamento com diferentes concentrações de curcumina (C001 – 0,01%; C003 – 0,03%; C05 – 0,5%; C1 – 1%) e grupo controle com DMSO 10%	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µL	Microlitro (s)
cm ²	Centímetro (s) quadrado (s)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HV	Hospital veterinário
IgG	Imunoglobulina G
J	Jaules
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mW	Megawhatt
NaCl	Cloreto de sódio
Nested-PCR	Nested polymerase chain reaction
nm	Nanômetro (s)
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
rDNA	DNA ribossômico
rRNA	RNA ribossômico
s	Segundos
Uesc	Universidade Estadual de Santa Cruz
UI	Unidade internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO GERAL.....	13
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4 REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1 O agente etiológico.....	14
4.2 Pitiose	15
4.3 Diagnóstico.....	17
4.4 Tratamento	19
4.5 Terapia fotodinâmica	20
4.6 Curcumina	21
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1 Isolado	22
5.2 Padronização dos fragmentos	24
5.3 Anfotericina B	25
5.4 Fotossensibilizador.....	25
5.5 Fonte luminosa	26
5.6 Citotoxicidade da Curcumina	26
5.7 Efeito luminoso.....	26
5.8 Efeito fotodinâmico	27
5.9 Avaliação do crescimento radial.....	29
6 RESULTADOS	30
7 DISCUSSÃO.....	35
8 CONCLUSÃO	38
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERENCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A pitiose é uma doença infecciosa que afeta diversas espécies animais, incluindo os seres humanos. Mesmo o agente etiológico sendo classificado no gênero *Phytium* em 1980, a classificação como nova espécie só foi possível em 1987, após estudos morfológicos e comparativos com espécies do mesmo gênero, sendo então denominado *Phythium insidiosum* (DE COCK, *et al.*, 1987). Taxonomicamente, *P. insidiosum* pertence ao reino Stramenopila, classe Peronosporomycetes (Oomycetes) (LÉVESQUE; DE COCK, 2004), no entanto, o seu aspecto morfológico macro e microscópico se assemelha ao dos fungos. Embora o *P. insidiosum* seja o principal agente etiológico causador da pitiose (GAASTRA *et al.*, 2010), 2010), Calvano *et al.*, (2011) relataram o isolamento de *P. aphanidermatum* na perna de um soldado ferido no Afeganistão.

A doença acontece em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, como no Sudeste Asiático, Costa Leste da Austrália e Nova Zelândia, América do Sul, Costa Rica, Guatemala, Haiti, Panamá, Nicarágua e América do Norte. Pode acometer humanos (incidência maior na Tailândia), aves, bovinos, ovinos, felinos, cães e equinos (MENDOZA; ALFARO, 1986; DE COCK, *et al.*, 1987; GAASTRA *et al.*, 2010; BOTTON *et al.*, 2011; YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020). O Brasil possui a maior incidência da enfermidade espécie equina no mundo, tendo o Pantanal grande destaque quando comparado às demais regiões do país (FERNANDA; RODRIGUES-, 2009).

A pitiose apresenta características potencialmente fatais (DE COCK *et al.*, 1987; GAASTRA *et al.*, 2010; KRAJAEJUN *et al.*, 2006; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). O seu diagnóstico é realizado com base em aspectos clínicos, avaliação microscópica das lesões e isolamento do agente etiológico. As culturas do *P. insidiosum* apresentam aspecto característico de colônias e hifas. Para correta identificação, atualmente são utilizadas técnicas padronizadas de biologia molecular, que se caracterizam por serem rápidas, com elevada sensibilidade na triagem de amostras positivas a partir do isolamento convencional (BOTTON *et al.*, 2011; DA PAZ, 2020).

As características da membrana celular dos oomicetos dificultam o estabelecimento de um tratamento adequado para as enfermidades causadas por esses microrganismos, uma vez que o uso de drogas antifúngicas, em sua maioria, tem como alvo as moléculas de ergosterol, levando à abertura de canais na membrana com consequente efluxo de íons seguido da morte do agente. No entanto, a biossíntese desse esteroide no *P. insidiosum* é incompleta (MACIEL

et al., 2008; DÓRIA, 2009; YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020; FERREIRA *et al.*, 2021; IANISKI *et al.*, 2021). O sucesso do tratamento da pitiose depende de fatores ligados diretamente às lesões e relacionados ao animal, sendo o insucesso e as recidivas frequentes (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). Por esse motivo, se faz necessário o estudo de novas abordagens terapêuticas, visando maior efetividade do tratamento dessa enfermidade. Sob essa perspectiva, testes de susceptibilidade *in vitro* com algumas terapias alternativas têm fornecido informações úteis para a seleção de um tratamento eficaz e padronizado.

Atualmente existem alguns relatos de sucesso na aplicação *in vitro* de terapia fotodinâmica antimicrobiana, inclusive para inativação do *P. insidiosum* (PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012; PIRES, 2012), a qual combina o uso de um fotossensibilizador, luz e oxigênio. Diversos fotossensibilizadores têm se mostrado eficientes na inativação de diversos microrganismos (PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012; PIRES, 2012). A curcumina é um composto fenólico, de origem natural, extraído do rizoma da *Curcuma longa*, e seu uso já é regulado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alguns trabalhos relatam seu potencial inibitório contra agentes gram-negativos, gram-positivos e fungos, não havendo ainda estudos sobre sua ação contra o *P. insidiosum* (PIRES, 2012; BABINSKI *et al.*, 2022).

Diante do exposto, esse estudo visa avaliar o efeito fotodinâmico *in vitro* da curcumina em diferentes concentrações associada ao led azul em diferentes tempos de irradiação a fim de identificar se este protocolo apresenta potencial inibitório sobre o *P. insidiosum*.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o crescimento radial do oomiceto *P. insidiosum* a partir da utilização da Anfotericina B e Terapia Fotodinâmica *in vitro*.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a Anfotericina B com aplicação de diferentes concentrações tem efeito oomicida no tratamento *in vitro* do *P. insidiosum*;

- Avaliar se a terapia fotodinâmica com aplicação de diferentes concentrações do fotossensibilizador curcumina e diferentes fluências da luz azul tem efeito oomicida no tratamento *in vitro* do *P. insidiosum*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O agente etiológico

As primeiras descrições de isolamento do *P. insidiosum* são de 1901, a partir de lesões cutâneas de equinos, sem que houvesse classificação do agente (MENDOZA; ALFARO, 1986). A partir de análises filogenéticas e moleculares do material, essa classificação somente foi realizada no ano de 1989 (MENDOZA; PRENDAS, 1988; LEAL *et al.*, 2002).

Os oomicetos pertencem ao Reino Stramenopila e são microrganismos encontrados no solo e água doce ou salgada, possuindo mais de 120 espécies (MARTIN; LOPER, 1999; LÉVESQUE; DE COCK, 2004). Algumas dessas espécies causam prejuízos na agronomia, outras podem parasitar fungos e larvas de mosquitos, enquanto o *P. insidiosum* é o principal agente patogênico para mamíferos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

As culturas de *P. insidiosum* se desenvolvem em meios de cultura seletivos para fungos e leveduras formando colônias de crescimento plano, de cor branca ou bege, com micélio aéreo curto e padrão radiado (Figura 1). Microscopicamente, as hifas são cilíndricas, largas e pouco septadas quando jovens (Figura 1) (MENDOZA; ALFARO, 1986; DE COCK, *et al.*, 1987).

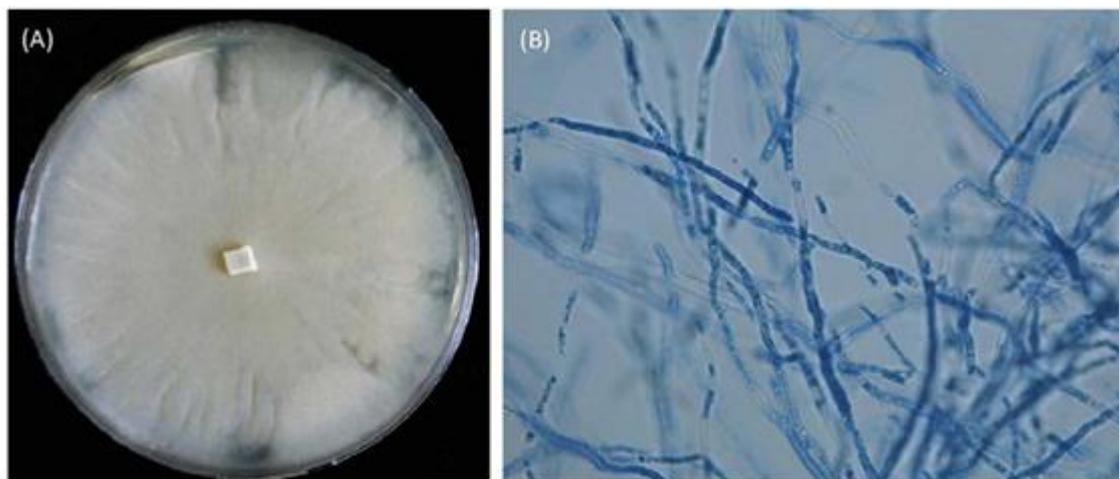


Figura 1- Aspecto macroscópico de colônia de *P. insidiosum* cultivada por 5 dias (A). Visão macroscópica do padrão de septação esparsa das hifas do *P. insidiosum* coradas com Azul de Lactofenol (B). Fonte: Gaastra *et al.*, 2010 (Adaptado)

As principais diferenças entre oomicetos e fungos estão na parede celular. A parede celular dos fungos possui quitina, enquanto a do *P. insidiosum* é formada principalmente por beta-glucanas e celulose. Os oomicetos apresentam também vacúolos de corpo denso, mitocôndrias de crista tubular e corpos de Golgi com múltiplas cisternas achatadas

(ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). De acordo com Alexopoulos e colaboradores (1996), devido a característica de septação esparsada, diferente do que ocorre em fungos verdadeiros, nota-se grande quantidade de núcleos em cada compartimento, sem que haja um número específico.

Além disso, a produção do aminoácido lisina nos fungos ocorre pela via do ácido alfa aminoadípico, enquanto os oomicetos, assim como as plantas, o sintetizam pela via do ácido diaminopimélico. Enquanto os fungos estocam glicogênio, os oomicetos estocam glucanas e polissacarídeos de forma semelhante à realizada pelas algas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). A diferença mais importante entre os oomicetos e os fungos se encontra no metabolismo de esterol. Enquanto fungos verdadeiros sintetizam ergosterol, esteroide de membrana celular, os oomicetos o incorporam do ambiente, não sendo esse composto produzido por eles, sendo este fato impeditivo para o sucesso do tratamento da pitiose com terapias antifúngicas, já que o principal mecanismo de ação dessas drogas é a inibição da síntese desse esteroide (DÓRIA, 2009; MACIEL *et al.*, 2018; YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020; FERREIRA *et al.*, 2021; IANISKI *et al.*, 2021).

O ciclo biológico do *Pythium* é caracterizado pela colonização de plantas aquáticas para a obtenção de substrato. A reprodução acontece de forma sexuada e os zoosporângios liberam zoósporos móveis (forma infectante), que são atraídos quimicamente por material vegetal ou tecido animal, se movimentam pela água e se aderem a esses tecidos, encistam e emitem budo germinativo, originando novo micélio. A produção de zoósporos depende de temperaturas elevadas (30 a 40°C) (MENDOZA; PRENDAS, 1988; GAASTRA *et al.*, 2010; YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020). Por ser capaz de sobreviver e multiplicar em ambiente que tenham plantas aquáticas, o microrganismo não necessita de hospedeiro mamífero para sobreviver e proliferar (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993).

4.2 Pitiose

O termo Pitiose foi proposto em 1980, a partir da classificação do agente etiológico causador da enfermidade no gênero *Phytium* (DE COCK, *et al.*, 1987). A doença ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. Os primeiros relatos em animais ocorreram em 1901, em equinos e, posteriormente, a doença foi descrita em cães, gatos, bovinos, ovinos, aves e animais silvestres (GAASTRA *et al.*, 2010). Em humanos, a primeira descrição ocorreu em 1985, na Tailândia, e outros são descritos na Costa Rica, Estados Unidos, Malásia, Austrália,

Haiti e Nova Zelândia (KRAJAEJUN *et al.*, 2006). No Brasil, o primeiro caso de pitiose humana foi relatado em 2005 em um paciente que apresentava lesão cutânea crônica irresponsiva aos tratamentos com antibiótico e antifúngico (BOSCO *et al.*, 2005).

A manifestação clínica associada à enfermidade depende do(s) órgão(ões) acometido(s), sendo comum principalmente o surgimento de lesões cutâneas, mas há relatos de ocorrência de lesões no trato gastrintestinal, próstata, região nasal, oftálmica, subcutânea, vascular e até de doença sistêmica (SANTURIO *et al.*, 1998; DYKSTRA *et al.*, 1999; JAEGER; ROTSTEIN; LAW, 2002; RIVIERRE *et al.*, 2005;KRAJAEJUN *et al.*, 2006).

O Brasil apresenta a maior incidência de pitiose em equinos em âmbito global, sendo a doença relatada em diversos estados, no entanto, o Pantanal Matogrossense é descrito como a região endêmica de maior ocorrência mundial (FERNANDA; RODRIGUES-, 2009). A forma cutânea é a mais frequente na espécie equina (DE COCK, *et al.*, 1987;CHAFFIN; SHUMACHER; MCMULLAN, 1995; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; REIS *et al.*, 2003; DÓRIA, 2009; GAASTRA *et al.*, 2010), que é caracterizada macroscopicamente por lesões de tamanhos variados com aparência tumoral e bordas irregulares com aspecto ulcerativo, granulomatoso e áreas necróticas (Figura 2). Há secreção que varia de serossanguinolenta a mucopurulenta e fétida (CHAFFIN; SHUMACHER; MCMULLAN, 1995; DÓRIA, 2009).



Figura 2- Aspecto macroscópico de lesão cutânea em equino com pitiose na região do abdômen. Fonte: Pires, 2012 (Adaptado)

Observam-se massas branco-amareladas denominadas “kunkers” com tamanho variado e formato irregular que se soltam facilmente das lesões (Figura 3), sendo essas estruturas formadas por uma resposta do organismo ao patógeno, incluindo células mortas e hifas do *P. insidiosum* (MENDOZA; ALFARO, 1986; CHAFFIN; SHUMACHER; MCMULLAN, 1995; DÓRIA, 2009). Essas estruturas são encontradas especificamente na pitiose equina e acabam

atuando como fonte importante de manutenção do microrganismo no ambiente (MENDOZA; ALFARO, 1986; DA SILVA FONSECA *et al.*, 2014).



Figura 3- “Kunkers” coletados de equino com pitiose cutânea. Fonte: Gaastra *et al.*, 2010 (Adaptado)

A segunda forma mais comum de manifestação nos equinos é a intestinal, que pode levar a quadros de cólica. Pode ocorrer ainda infecção em tecido ósseo e disseminação via linfática para pulmões e linfonodos regionais (REIS *et al.*, 2003; DÓRIA, 2009).

Não há relatos de transmissão direta da infecção por *P. insidiosum* entre animais e homens, porém, o potencial zoonótico precisa ser mais bem elucidado, uma vez que alguns autores associam a transmissão por hifas, esporos encistados e oogônias, o que levaria à possibilidade de infecção a partir de contato com material contaminado (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993).

Não há fatores predisponentes, porém, alguns estudos sugerem quimiotaxia dos zoósporos por substâncias presentes em tecido animal e, após a aderência em lesões já existentes ou folículo piloso, há provável liberação de glicoproteínas pelo próprio hospedeiro que o fixa, permitindo a formação do tubo germinativo e produção de hifas que penetram tecidos subjacentes desenvolvendo a lesão (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993).

4.3 Diagnóstico

A pitiose é uma doença potencialmente fatal e o diagnóstico definitivo é de crucial importância (GROOTERS; GEE, 2002). Métodos como cultivo, histopatologia, imunohistoquímica, sorologia e técnicas moleculares podem ser utilizadas para o diagnóstico (GROOTERS; GEE, 2002; BOSCO *et al.*, 2005; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005; GAASTRA *et al.*, 2010; LOHNOO *et al.*, 2019).

O método convencional envolve isolamento do oomiceto com posterior avaliação morfológica das hifas e produção de zoósporos. No entanto, o isolamento pode ser dificultado devido à infecção bacteriana comumente associada às lesões, além das características microscópicas se assemelharem a de fungos verdadeiros e de outras espécies de *Pythium* produzirem também zoósporos (GROOTERS *et al.*, 2002).

A avaliação histopatológica apresenta bons resultados quando os cortes são corados pela técnica de metenamina nitrato de prata de Grocott- Gomori (GMS), sendo possível visualizar as hifas ramificadas e irregulares, pouco septadas (ARLINGTON HEADLEY; NEVES; JUNIOR, 2004; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005; TROST *et al.*, 2009).

A imuno-histoquímica é uma técnica diagnóstica que associa histopatologia e anticorpos policlonais apresentando alta especificidade e sensibilidade na identificação de fungos em tecidos fixados em formol (GALIZA *et al.*, 2014), no entanto, segundo Grooters e Gee (2002), pode haver reações cruzadas com outros fungos quando usada para diagnóstico de pitiose.

No que diz respeito ao diagnóstico sorológico, segundo Krajaejun e colaboradores (2006), a imunodifusão e o ELISA são usados com frequência no diagnóstico de pitiose em humanos. Em 2016 foi desenvolvido um teste imunocromatográfico para detecção de IgG anti-*P. insidiosum* para humanos, cães, gatos, equinos, bovinos e coelhos, sendo este 100% específico e 90,6% sensível (INTARAMAT *et al.*, 2016).

Dentre as técnicas diagnósticas utilizadas, a que mais tem ganhado destaque devido à alta especificidade e rapidez é o diagnóstico molecular (ESPY *et al.*, 2006). Em 2002 foi padronizada a técnica de nested-PCR para *P. insidiosum* utilizando a região rDNA-ITS (GROOTERS; GEE, 2002) e, posteriormente, em 2013 foi desenvolvido uma nested-PCR com amplificação de regiões da subunidade 18S do gene rRNA do *P. insidiosum* (THONGSRI *et al.*, 2013). Já em 2015, Keeratijarut e colaboradores padronizaram uma qPCR com o uso de iniciadores moleculares derivados da região PinsEXO1. Em 2020, da Paz padronizou uma reação de qPCR tendo o gene ELI025 como alvo, com elevada sensibilidade, a partir da utilização de material genético extraído diretamente de “kunkers” removidos das lesões. Vale destacar que em todas os outros protocolos descritos anteriormente, a extração do DNA era realizada a partir das culturas, dessa forma, a utilização de DNA extraído diretamente a partir dos “kunkers” possibilitou maior rapidez e precisão diagnóstica, já que não é necessário realizar o isolamento do agente nem aguardar o crescimento das hifas.

4.4 Tratamento

O principal tratamento empregado nos casos de pitiose é a excisão cirúrgica com ampla margem de segurança, caso não haja envolvimento de estruturas anatômicas nobres (MILLEK A N; CAMPBELL, 1982; MENDOZA; ALFARO, 1986). No entanto, as chances de recidiva são altas. Em humanos e algumas espécies animais, muitas vezes são recomendadas cirurgias radicais e amputação (MCMULLA, 1977; MENDOZA; PRENDAS, 1988; KRAJAEJUN *et al.*, 2006).

Tratamentos químicos com o uso de drogas antifúngicas usadas na rotina clínica não apresentam efetividade, uma vez que estas atuam na inibição do ergosterol, e o *P. insidiosum* o incorpora ao invés de produzi-lo (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Além de antifúngicos, compostos iodínicos também são utilizados com resultados incertos (A MEIRELES *et al.*, 1992; CHANFFIN; SHUMACHER; HOOPER, 1992; RODRIGUES; LUVIZOTTO, 2000). Ainda assim, drogas como anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e iodeto de potássio continuam sendo testadas em tratamentos clínicos e testes de sensibilidade *in vitro*, uma vez que alguns autores relatam sucesso em alguns tratamentos associados ou não à remoção cirúrgica (GONZÁLEZ CH *et al.*, 1979; MILLEK A N; CAMPBELL, 1982; CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N., 1992; SEKHON; PADHYE; GARG, 1992; PEREIRA *et al.*, 2007; CAVALHEIRO *et al.*, 2009).

Millek e campbell (1982) propuseram o uso de imunoterápicos produzidos a partir de culturas do próprio agente. Alguns anos depois foi relatada cura em um ser humano submetido ao tratamento imunoterápico após o insucesso com inúmeros outros tratamentos (THITITHANYANONT *et al.*, 1998). No entanto, o sucesso no uso da vacina é variável, dependendo de fatores 1 ao indivíduo e tempo de evolução da lesão (MILLEK A N; CAMPBELL, 1982).

Na tentativa de estabelecimento de protocolos de tratamento, muitos pesquisadores desenvolvem testes de sensibilidade *in vitro* com diversas drogas diferentes (PEREIRA *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2014; IANISKI *et al.*, 2021). Anteriormente esses testes eram realizados utilizando os zoósporos, o que provocava dificuldades na sua realização, uma vez que há dificuldade na obtenção do zoósporo e que as respostas obtidas podem não ser não aplicáveis clinicamente, uma vez que o agente nas lesões se apresenta na forma de hifa (FERREIRA *et al.*, 2021). Em 2014, Fonseca e colaboradores propuseram o uso do cultivo micelial para esses testes, facilitando a padronização da metodologia e mimetizando melhor as

características do agente no tecido infectado. Desde então, diversos testes têm sido realizados utilizando antimicrobianos, anti-inflamatórios, antifúngicos, fitoterapia, ozonioterapia e terapia fotodinâmica na tentativa de se estabelecer protocolos efetivos no tratamento da enfermidade (PIRES, 2012; FERREIRA et al., 2021).

4.5 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica passou a ter uso medicinal a partir de 1903 para o tratamento de câncer de pele superficial, sífilis e outras doenças. Nesse tipo de terapia, a combinação de luz, oxigênio e agente fotossensibilizador provoca danos às células, levando-as à morte (ACKROYD *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação pode ocorrer pela formação de radicais livres, que reagem com o oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxila que, em concentrações elevadas, promovem danos às organelas celulares, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (VALKO, 2007; ZHU *et al.*, 2008). O segundo e mais importante mecanismo de ação na terapia fotodinâmica ocorre a partir da formação de oxigênio singleto que é altamente reativo, podendo reagir com ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, provocando aumento da permeabilidade na membrana celular e morte celular (ROSEIN, 2006; ZHU *et al.*, 2008).

Para o fotossensibilizador é importante avaliar o tipo de concentração, via de administração e período de pré irradiação que será aplicado. No que diz respeito a iluminação, é necessário avaliar o comprimento de onda, irradiância e a dose de energia que será aplicada (DA PAZ, 2020).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana tem sido amplamente estudada, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e utilizada como alternativa para o combate a microrganismos resistentes a fármacos antimicrobianos. Já há disponibilidade de dados de efetividade contra bactérias gram-positivas e negativas, fungos, vírus, leveduras, protozoários e parasitas. Por essa terapia promover danos em diversas estruturas celulares, a possibilidade do desenvolvimento de resistência é reduzida, sendo esta então altamente efetiva (PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012; BALTAZAR *et al.*, 2015).

Em estudos *in vitro*, Pires (2012) relatou inativação do agente quando as culturas do *P. insidiosum* foram submetidas à terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador Photogem® e

Photodithazine®, em diferentes concentrações e fluências de luz. A avaliação foi realizada a partir da documentação fotográfica e mensuração do crescimento radial dessas culturas.

4.6 Curcumina

A curcumina é um composto orgânico extraído do rizoma da *Curcuma longa*, constituindo 2 a 5% desta e é reconhecido por diversas agências de saúde. Já é utilizada há muito tempo na medicina chinesa e indiana como fitoterápico devido a propriedades anti-inflamatórias, antioxidante e antimicrobiana, além de ser amplamente utilizada na indústria de alimentos e farmacêutica, tendo estudos sobre sua ação como agente anticancerígeno, antienvhecimento e cicatrizante (DOVIGO et al., 2011; AKBIK et al., 2014; SUETH-SANTIAGO et al., 2015; SUZUKI; CARLOS, 2015; VOLLONO et al., 2019).

O uso desse composto como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica antimicrobiana tem sido pesquisado devido à sua capacidade de absorção óptica na região próxima à luz azul (300 a 500 nm) e a geração de espécies reativas de oxigênio (REGO FILHO, 2014; BARBOSA, 2017).

Há relatos de testes que descrevem a inativação total de bactérias *in vitro* e o controle de infecções provocadas em cobaias ou pacientes em tratamento odontológico, demonstrando o potencial fototóxico desse composto. É relatada também a efetividade do tratamento com esse composto em biofilme de microrganismos como o *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (BABINSKI et al., 2022).

Referente ao uso da curcumina como fotossensibilizador para a inibição fúngica, todos os trabalhos descritos em literatura são referentes ao Gênero *Candida*. Há relatos da inativação completa na forma planctônica e quase total na forma de biofilme, demonstrando potencial efetividade (BABINSKI et al., 2022). No entanto, não há relatos no uso da curcumina na inativação do *P. insidiosum*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Isolado

Foram atendidos oito equinos com lesões sugestivas de pitiose (Figura 4) no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Estadual de Santa Cruz (Uesc) durante o período 01 de março até 20 de dezembro de 2024.



Figura 4- Potro atendido no Hospital Veterinário da Uesc com lesão sugestiva de pitiose.

Para isolamento do agente, foi realizada excisão cirúrgica do tecido lesionado para obtenção dos “kunkers” (Figura 5) e, logo após a separação destes do tecido excisado, foi realizada a primeira lavagem. Nos primeiros cinco casos, essa lavagem foi realizada apenas com solução fisiológica, no entanto, foi notada grande dificuldade de isolamento devido à contaminação bacteriana das placas. Então, optou-se pela primeira lavagem ser realizada com solução de clorexidina degermante a 2% e solução fisiológica a 0,9% com agitação, seguida de enxágue apenas com solução fisiológica para a remoção de qualquer resíduo tecidual e coágulos que estivessem aderidos a eles.



Figura 5- “Kunkers” obtidos de tecido lesionado após excisão cirúrgica.

Posteriormente, os “kunkers” foram colocados em tubo Falcon estéril contendo solução fisiológica e foram encaminhados em isopor com gelo reciclável ao Laboratório de Microbiologia do HV-Uesc para processamento. O material passou por lavagem sequencial por agitação leve em tubos de vidro estéreis com solução salina contendo 13.900 UI/mL de Penicilina até que a coloração do líquido não apresentasse mais turbidez (Figura 6). Então, eles foram retirados dos tubos com auxílio de pinça esterilizada em chama e, antes de serem fragmentados, foram secos com gaze estéril. Para fragmentação, os “kunkers” eram colocados sobre lâminas limpas com álcool 70% e flambadas para posterior corte de aproximadamente 2mm de espessura com lâmina de bisturi.



Figura 6- Lavagem sequencial dos “Kunkers” coletados de lesões de equinos atendidas no Hospital Veterinário da Uesc.

Em seguida, os fragmentos eram depositados em placas de Petri contendo meio Sabouraud com Clorafenicol (Figura 7), para evitar contaminação bacteriana, de forma que a parte central do “kunker” tivesse contato direto com o meio de cultivo. Após 24 horas de

incubação a 37°C, verificava-se se havia o crescimento de colônias filamentosas de aspecto membranoso, bordas irregulares, incolores ou de coloração branca suave e micélios aéreos muito curtos na placa, porém, o recultivo só foi realizado após três a cinco dias de crescimento, para que o raio das colônias estivesse maior.

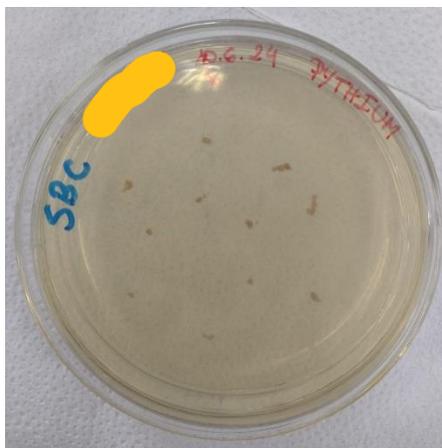


Figura 7- Fragmentos de “kunkers” semeados em placa de Petri contendo meio Sabouraud com Clorafenicol.

Para recultivo, eram feitos cortes do meio de cultura que continham as hifas do oomiceto e estes eram depositados em novo meio de cultura, dessa vez em placas contendo apenas Sabouraud a 4%. Após o crescimento deste último durante cinco a sete dias, foi feita a avaliação microscópica a partir de microcultivo e as culturas que apresentavam hifas com ramos largos em ângulo agudo e esparsamente septados foram classificadas como possivelmente positivas e passaram por recultivo até realização do diagnóstico molecular.

As culturas que apresentaram características macro e microscópicas de acordo com as que estavam descritas na literatura foram enviadas para o departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas para identificação específica por biologia molecular. As que apresentaram resultado positivo no diagnóstico molecular foram replicadas a cada 14 dias até iniciar os ensaios de inibição para preservação das culturas.

5.2 Padronização dos fragmentos

Os ensaios de inibição foram realizados com o oomiceto na forma de hifa, uma vez que esta é a forma do agente encontrada nas lesões, fornecendo dados relevantes para futura aplicação do tratamento em pacientes infectados. Para isso, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud 4%, com incubação por cinco a sete dias a 37°C e

foram retirados fragmentos padronizados de, aproximadamente, 5mm de diâmetro das bordas da cultura. Esses fragmentos foram então colocados em novas placas contendo o mesmo meio de cultivo para realização dos ensaios de inibição. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.3 Anfotericina B

Os fragmentos padronizados foram submetidos ao tratamento com concentrações de Anfotericina B contendo 25, 50 e 100 μ /mL diluídas em solução salina a 0,9%, a partir da concentração inicial comercial contendo 5 mg/mL. Para os ensaios de inibição foram colocados 10 μ L de cada solução sobre o fragmento, volume suficiente para cobri-lo por completo. Para efeito comparativo, foi testado um grupo controle para cada concentração adicionando o mesmo volume de solução salina a 0,9%. Após os tratamentos, todas as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 168 horas (Figura 8).

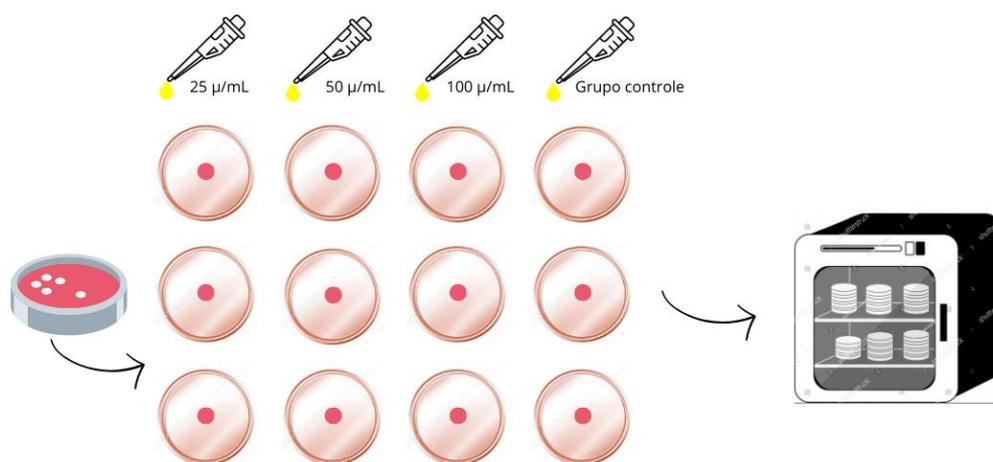


Figura 8- Diagrama demonstrando o teste de inibição realizado com as diferentes concentrações de Anfotericina B sobre o crescimento do *P. insidiosum*.

5.4 Fotossensibilizador

Foi avaliado o fotossensibilizador Curcumina diluído em DMSO 10%. Foram testadas as concentrações de 0,01%, 0,03%, 0,5% e 1% de curcumina. Todas as formulações, inclusive o DMSO 10%, foram adquiridas na farmácia de manipulação UPVET BH.

5.5 Fonte luminosa

Foi utilizado o equipamento de led azul D-2000 da marca DMC ABC Equipamentos e a irradiação foi realizada de forma individual em cada placa. O diâmetro de saída da sonda do equipamento foi de 8mm, permitindo que o fragmento padronizado fosse irradiado de forma homogênea. O comprimento de onda do equipamento é de 490 nm, com irradiância de até 1100mW/cm².

5.6 Citotoxicidade da Curcumina

A avaliação da citotoxicidade da Curcumina foi realizada a partir da aplicação de 10 µL do composto de maior concentração (1%) sobre o crescimento padronizado do *P. insidiosum* e o mesmo volume de solução de DMSO 10% para efeito comparativo como grupo controle. Após a aplicação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, durante 168 horas (Figura 9).

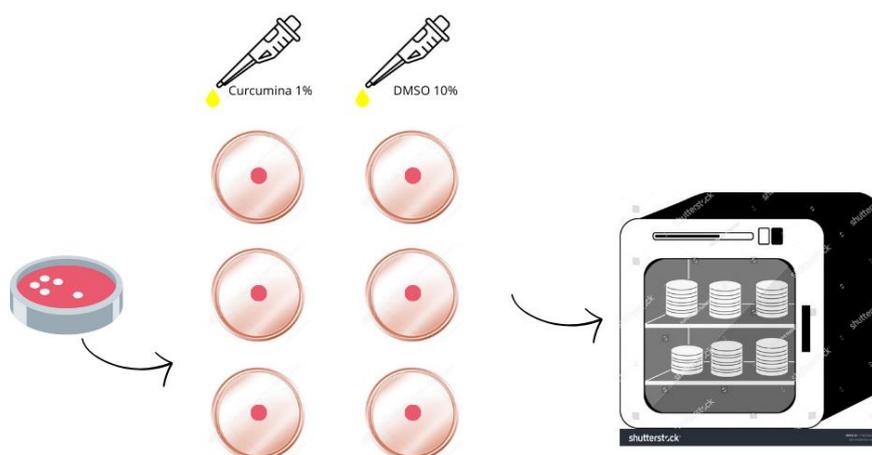


Figura 9- Diagrama demonstrando o teste de citotoxicidade da curcumina a 1% e grupo controle com DMSO a 10% sobre o crescimento do *P. insidiosum*.

5.7 Efeito luminoso

Os fragmentos foram irradiados pelo led azul com intensidade de 500mW/cm² e fluência de 50 J/cm² por 50 segundos, sendo esse o maior tempo testado no efeito fotodinâmico. Como grupo controle, foram cultivados os fragmentos padronizados sem nenhuma exposição à luz, com o mesmo período e temperatura de incubação já citada anteriormente (Figura 10).

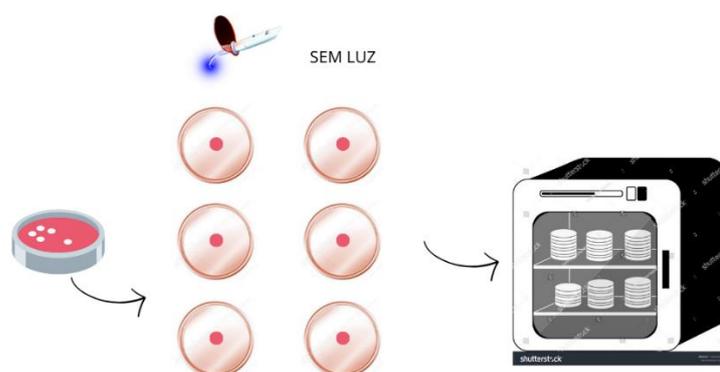


Figura 10- Diagrama demonstrando o teste com aplicação da luz e controle sem aplicação da luz sobre os fragmentos de cultura do *P. insidiosum*.

5.8 Efeito fotodinâmico

Para avaliação do efeito fotodinâmico antimicrobiano, foram acrescidos 10 μ L de cada concentração de curcumina (0,01%, 0,03%, 0,5% e 1%) sobre os fragmentos padronizados das culturas. Após a aplicação das soluções de curcumina, as amostras foram incubadas por 20 minutos em estufa a 37°C e, posteriormente, foram tratadas com o led azul apenas uma vez (Figura 11).

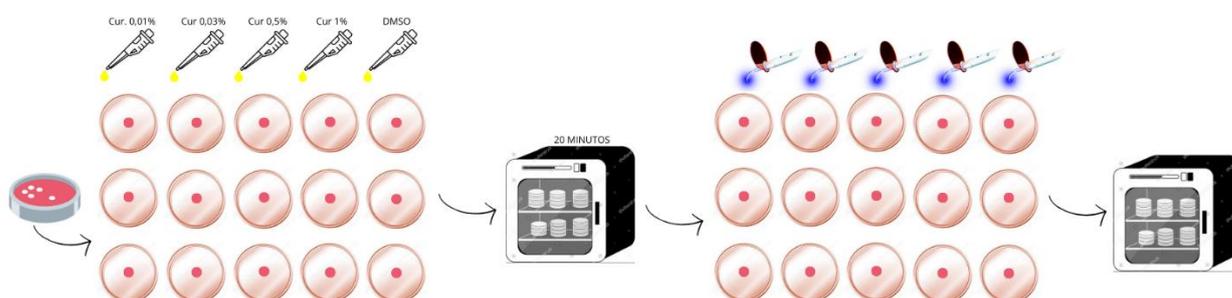


Figura 11- Diagrama demonstrativo do teste de inibição da terapia fotodinâmica sobre o crescimento do *P. insidiosum*.

A saída da sonda foi posicionada de uma forma que cobrisse todo o fragmento e a aplicação do led foi feita sobre a placa fechada para que não houvesse contaminação ao abri-la, uma vez que o procedimento não foi realizado em cabine de fluxo laminar devido às limitações impostas pela estrutura física do Laboratório de Microbiologia da Uesc e, não pôde ser realizado próximo a chama para melhor aproveitamento de luz e isolamento da aplicação. Para isso, foi

adaptada uma caixa forrada com papel alumínio, na qual era encaixado o equipamento e colocada a placa (Figura 12) e, durante todo o período de irradiação, a caixa permanecia fechada. Como grupo controle negativo, foi acrescido o mesmo volume de DMSO 10%, sendo irradiados os mesmos períodos de luz que os grupos tratados. Após a aplicação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 168 horas. Os tempos de tratamento, energia e densidade energética do led azul que foram aplicados sobre cada fragmento de amostra estão descritos na Tabela 1.

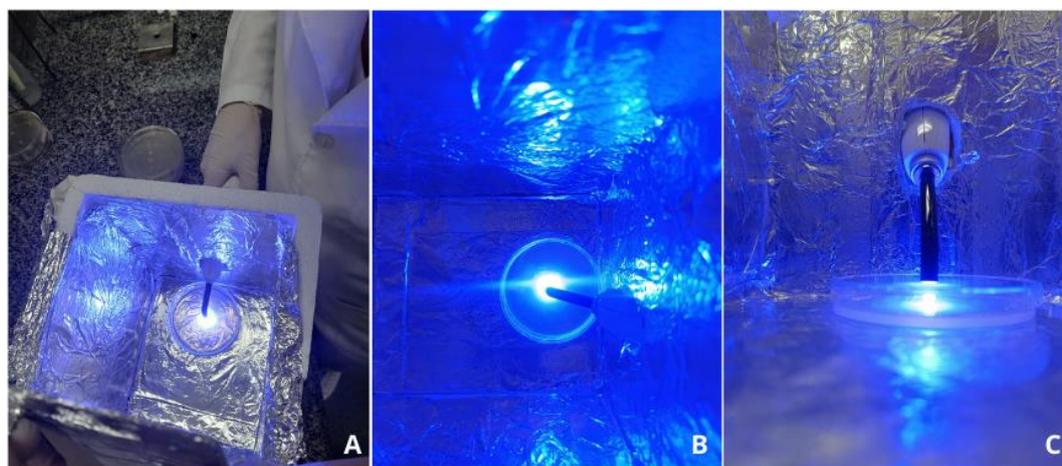


Figura 12- Demonstração do método de aplicação do led azul. (A) Vista superior externa com a caixa aberta. (B) Vista superior interna. (C) Vista frontal interna com caixa fechada.

Tabela 1- Tempos aplicados e suas respectivas energia e densidade energética

Tempo (s)	Energia (J)	Densidade Energética (J/cm²)
5	2,5	5
10	5	10
20	10	20
30	15	30
40	20	40
50	25	50

s= segundos; J= jaules; J/cm²= jaules por centímetro quadrado.

As concentrações, diluente e tempos de tratamento com o led azul foram escolhidos a partir da revisão de literatura realizada previamente, sendo utilizadas as que demonstraram sucesso em tratamento contra fungos, uma vez que não há descrição em literatura de trabalhos testando a curcumina como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica antimicrobiana para inativação do *P. insidiosum*.

5.9 Avaliação do crescimento radial

Para avaliação do crescimento radial foram realizadas fotografias com 24, 48 e 168 horas após os ensaios de inibição. Para determinação da área de crescimento dos fragmentos, foram realizadas medidas através do software ImageJ® (Figura 13) (Image processing and analysis in JAVA). A partir dos valores de área obtidos, foi realizada a análise estatística entre os diferentes tratamentos através do software R.

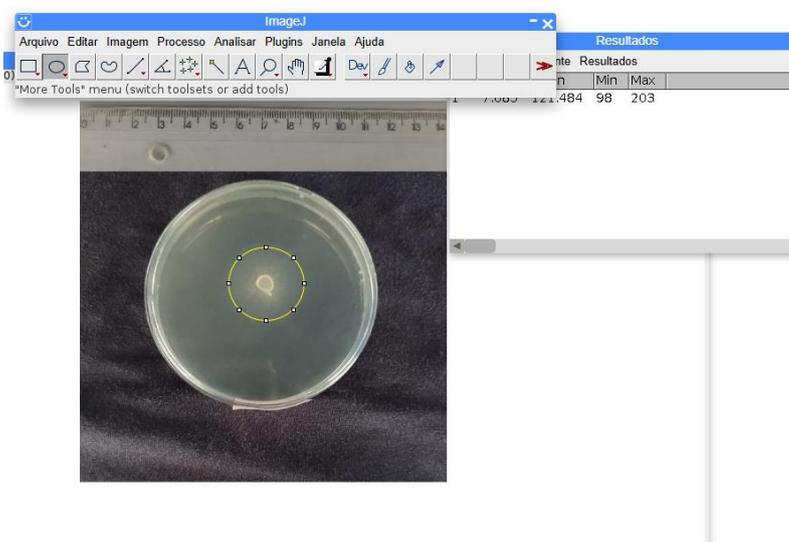


Figura 13- Imagem representativa da utilização do software para obtenção da medida da área das colônias.

A realização da análise estatística foi feita a partir da comparação entre as áreas de crescimento radial a partir dos diferentes tratamentos realizados utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Além disso, foi empregado o teste de Dunn para as comparações múltiplas e identificação de diferenças entre os grupos controle, efeito fotodinâmico e Anfotericina B.

6 RESULTADOS

Isolado

Foram avaliados oito animais atendidos no HV-Uesc com lesões cutâneas que apresentavam mais de três semanas de evolução, já haviam sido tratadas sem sucesso anteriormente e apresentavam aspecto granulomatoso, ulcerado, com áreas necrosadas, com secreção serossanguinolenta de odor fétido e aspecto viscoso e que apresentavam massas branco amareladas e firmes que se desprendiam facilmente, sendo essas sugestivas de pitiose. Essas massas (“kunkers”) foram coletadas e, após o isolamento, as culturas foram enviadas para o departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas para identificação específica por biologia molecular, sendo apenas três dessas positivas para *P. insidiosum*.

Essas três amostras foram submetidas aos ensaios de inibição no Laboratório de Microbiologia do HV-Uesc, comparando os efeitos de grupos tratados e grupos controle para posterior avaliação do crescimento radial após 24, 48 e 168 horas.

Diante da avaliação, foi notado que dentre as concentrações de Anfotericina B avaliadas, nenhuma apresentou inibição total do crescimento radial de *P. insidiosum*, no entanto, a concentração de 100 µL foi estatisticamente diferente do grupo controle (solução fisiológica) nas primeiras 24 horas. No que diz respeito à avaliação após 48 horas, as concentrações de 25 µL e 100 µL apresentaram valores estatísticos diferentes também em relação ao grupo controle e, após 168 horas, as três concentrações apresentaram crescimento diferente do grupo controle, o que pode ser notado na Figura 14 e Tabela 2.

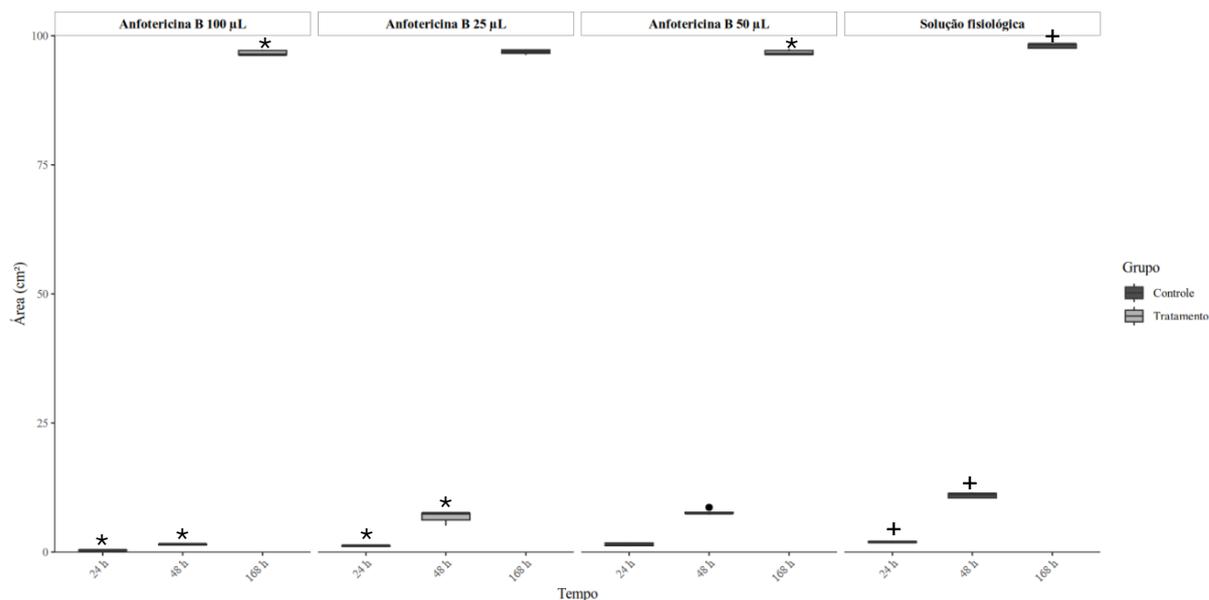


Figura 14- Box plot demonstrando a Área (cm²) do crescimento radial comparativo entre os tratamentos com Anfotericina B a 100 µL, 25 µL e 50 µL com o grupo controle tratado com Solução fisiológica. Parâmetros identificados com * apresentam diferença estatística do controle identificado com + (p < 0,05).

Tabela 2- Média ± DP da área de crescimento das colônias (cm²) de *P. insidiosum* após tratamento com diferentes concentrações de Anfotericina B e grupo controle (solução fisiológica)

Tempo (h)	Grupo			
	Sol. Fisiológica	Anfotericina 25µL	Anfotericina 50µL	Anfotericina 100µL
24	1.94 ± 0.11 ^a	1.22 ± 0.08	1.48 ± 0.26	0.35 ± 0.03 ^b
48	11.09 ± 0.46 ^a	6.79 ± 1.04 ^b	7.64 ± 0.42	1.50 ± 0.09 ^b
168	98.10 ± 0.38 ^a	96.88 ± 0.38 ^b	96.67 ± 0.46 ^b	96.59 ± 0.46 ^b

^{a, b} Letras diferentes dentro da mesma linha são estatisticamente diferentes (p < 0,05).

Quanto à avaliação da citotoxicidade da curcumina sobre *P. insidiosum*, também não houve inibição do crescimento das colônias, no entanto, houve diferença significativa na comparação entre os grupos em que houve a aplicação da curcumina a 1% e aplicação de DMSO 10% (controle), como pode ser notado na Tabela 3.

Tabela 3- Média \pm DP da área de crescimento das colônias (cm²) de *P. insidiosum* após tratamento com a curcumina a 1% e grupo controle com DMSO 10%

Tempo (h)	Grupo	
	DMSO 10%	Curcumina 1%
24	1.473 \pm 0.336 ^a	0.978 \pm 0.162 ^b
48	6.428 \pm 2.405 ^a	3.092 \pm 0.360 ^b
168	98.381 \pm 0.200 ^a	98.381 \pm 0.200 ^b

^{a, b} Letras diferentes dentro da mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No que diz respeito ao efeito luminoso, foi notada diferença significativa apenas nas primeiras 24 horas que pode ser notado na figura 15 e Tabela 4.

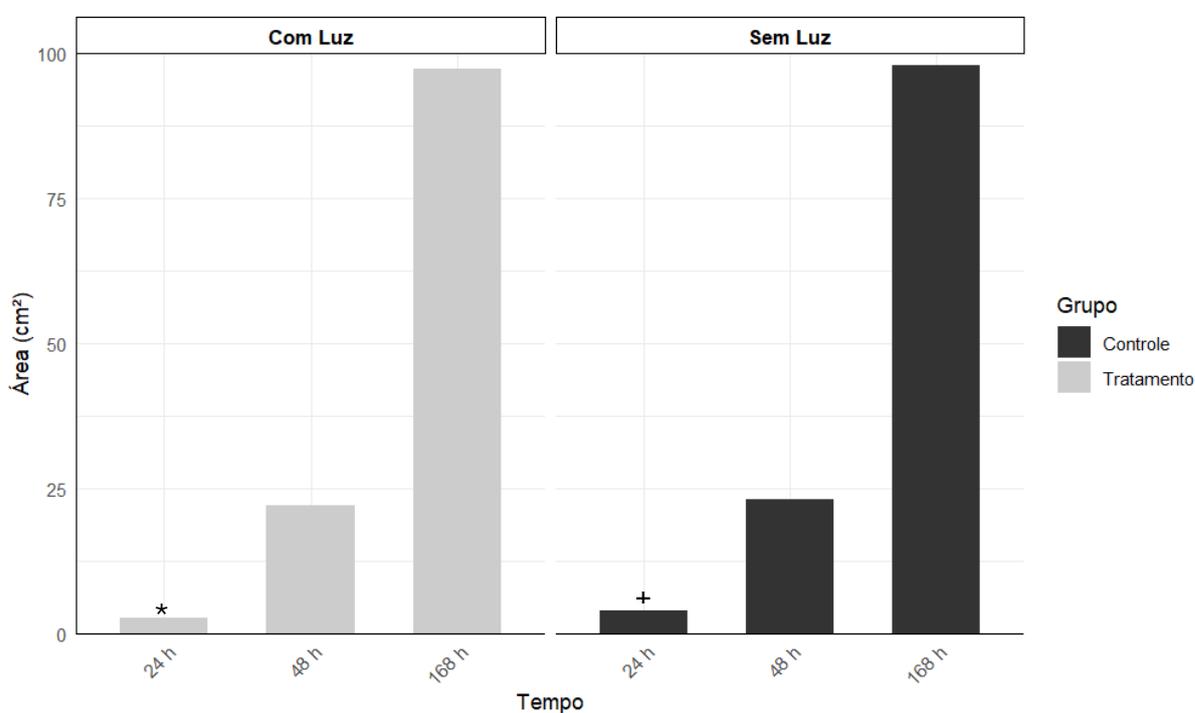


Figura 15- Gráfico de barras demonstrando a Área (cm²) do crescimento radial comparativo entre os fragmentos tratados com 50J/cm² de led azul o grupo controle, sem aplicação de luz. Parâmetros identificados com * apresentam diferença estatística do controle identificado com + ($p < 0,05$).

Tabela 4- Média \pm DP da área de crescimento das colônias (cm²) de *P. insidiosum* após tratamento com led azul na fluência de 50J/cm² e grupo controle sem luz.

Tempo (h)	Grupo	
	Sem luz	Com luz
24	3.059 \pm 0.543 ^a	2.470 \pm 0.091 ^b
48	21.841 \pm 0.799	21.909 \pm 0.248
168	97.157 \pm 0.510	97.022 \pm 0.239

^{a, b} Letras diferentes dentro da mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Quanto à avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento radial de *P. insidiosum*, houve diferença estatística significativa entre vários grupos tratados em relação ao controle (Tabela 5). Além disso, foi possível observar que quando as amostras foram tratadas com a curcumina a 1%, houve inibição homogênea em todas as culturas nas primeiras 24 horas, não havendo crescimento radial em nenhum dos tempos de aplicação do led azul. O crescimento foi notado nas avaliações de 48 e 168 horas (Figura 14), ainda assim, se destaca a diferença da área de crescimento nesse período quando comparado ao grupo controle tratado com DMSO 10% em algumas concentrações (Tabela 5).

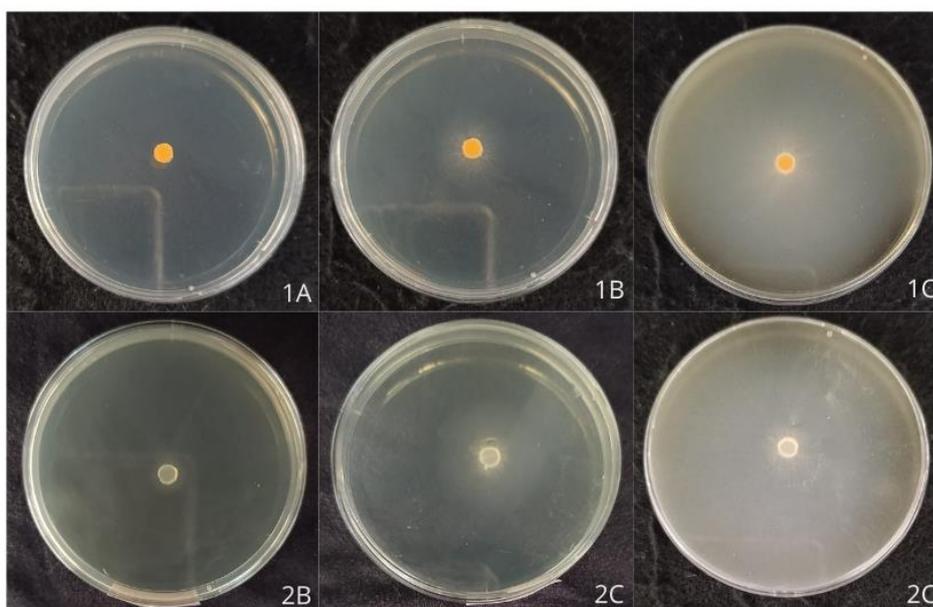


Figura 16- Comparação entre as colônias do *P. insidiosum* do grupo tratado com curcumina 1% com irradiação de luz azul por vinte segundos (1) e o grupo controle (2) apenas com DMSO 10%. A, B e C representam as idades das colônias às 24, 48 e 168 horas, respectivamente.

Tabela 5- Média \pm DP da área de crescimento das colônias (cm²) de *Pythium insidiosum* após tratamento com diferentes concentrações de curcumina (C001 – 0,01%; C003 – 0,03%; C05 – 0,5%; C1 – 1%) e grupo controle com DMSO 10%

Tempo (h)	Aplicação (s)	Grupo				
		Controle	C001	C003	C05	C01
24	5	2.03 \pm 0.22 ^a	1.53 \pm 0.40	0.81 \pm 0.07 ^b	0.79 \pm 0.11 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{b, C}
	10	1.94 \pm 0.26 ^a	1.76 \pm 0.59	0.91 \pm 0.11 ^b	0.98 \pm 0.12 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{b, C}
	20	2.11 \pm 0.24 ^a	1.30 \pm 0.20 ^b	1.10 \pm 0.13 ^b	0.99 \pm 0.16 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{b, C}
	30	2.03 \pm 0.22 ^a	1.22 \pm 0.17 ^b	1.29 \pm 0.18 ^b	0.77 \pm 0.11 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{b, C}
	40	2.26 \pm 0.59 ^a	1.50 \pm 0.31 ^b	0.95 \pm 0.33 ^b	1.15 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00 ^{b, C}
	50	2.05 \pm 0.21 ^a	1.61 \pm 0.21 ^b	0.89 \pm 0.07 ^b	0.87 \pm 0.12 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{b, C}
48	5	14.44 \pm 5.29 ^a	10.17 \pm 3.12 ^b	9.46 \pm 1.73	8.68 \pm 4.07 ^b	2.02 \pm 0.52 ^b
	10	15.90 \pm 0.65 ^a	8.627 \pm 5.42 ^b	8.34 \pm 2.44 ^b	8.29 \pm 2.33 ^b	3.21 \pm 1.24 ^b
	20	14.79 \pm 1.24 ^a	6.60 \pm 2.28 ^b	10.71 \pm 2.09 ^b	13.23 \pm 2.49 ^b	6.02 \pm 2.76 ^b
	30	14.79 \pm 1.24 ^a	7.42 \pm 3.87 ^b	13.78 \pm 1.18	7.94 \pm 4.74 ^b	2.67 \pm 1.65 ^b
	40	14.79 \pm 1.25 ^a	7.97 \pm 0.70 ^b	8.96 \pm 3.88 ^b	12.12 \pm 1.58 ^b	3.45 \pm 1.38 ^b
	50	14.79 \pm 1.24 ^a	8.44 \pm 1.13	6.76 \pm 2.59 ^b	7.39 \pm 2.95 ^b	1.23 \pm 0.13 ^b
168	5	92.96 \pm 3.54	92.52 \pm 3.76	97.51 \pm 0.37	92.52 \pm 3.76	92.52 \pm 3.76
	10	88.47 \pm 7.52	71.84 \pm 9.98	97.74 \pm 0.49	71.84 \pm 29.98	71.84 \pm 29.98
	20	98.13 \pm 0.00 ^a	80.25 \pm 16.06	98.19 \pm 0.26 ^b	80.25 \pm 16.06	80.25 \pm 16.06
	30	95.37 \pm 2.88 ^a	81.37 \pm 8.59 ^b	98.30 \pm 0.32	81.37 \pm 8.59 ^b	81.37 \pm 8.59 ^b
	40	98.07 \pm 0.14 ^a	85.53 \pm 4.63 ^b	97.90 \pm 0.29 ^b	85.53 \pm 4.63 ^b	85.53 \pm 4.63 ^b
	50	98.13 \pm 0.00 ^a	85.69 \pm 3.66 ^b			

^{a, b} Letras diferentes dentro da mesma linha são estatisticamente diferentes. ^c Letras iguais dentro da mesma coluna representa grupos iguais entre si ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

O método de isolamento de *P. insidiosum* de lesões equinas descrito em literatura é realizado a partir dos “kunkers”, no entanto, a contaminação bacteriana secundária é um fator limitante para o sucesso do procedimento (GROOTERS *et al.*, 2002). No presente estudo, as primeiras amostras foram tratadas de acordo com o protocolo descrito previamente por Ferreira e colaboradores (2021) e Pires (2012), o qual utiliza solução de cloreto de sódio a 0,9% com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, no entanto, notou-se intensa contaminação bacteriana nas placas, não sendo possível a observação do crescimento do *P. insidiosum*. Então, esse protocolo foi adaptado, sendo a primeira lavagem desses “kunkers” realizada com 1 mL de clorexidina degermante a 2% em 20 mL de NaCl a 0,9%, logo após a coleta, por esta apresentar efeito residual, reduzindo unidades formadoras de colônias quando utilizada para procedimento de antisepsia (URQUIZA *et al.*, 2016).

Além disso, para lavagem dos “kunkers” em laboratório, optou-se pelo uso de um antibiótico beta-lactâmico, a penicilina. Gaastra e colaboradore (2010) destacaram o uso de ampicilina, antibiótico de mesma classe farmacológica, apenas para o transporte de amostras. No entanto, o presente estudo demonstrou que a adaptação do protocolo de lavagem desses “kunkers” permitiu menor contaminação bacteriana das placas, facilitando o isolamento do agente.

Ainda sobre o isolamento do agente, nesse trabalho foi realizada outra adaptação de protocolos propostos anteriormente (PIRES, 2012; FERREIRA *et al.*, 2021), pois, mesmo após o primeiro tratamento dos “kunkers” citado anteriormente, sucessivas lavagens com solução fisiológica a 0,9% contendo penicilina e todos os cuidados com o uso de material estéril para processamento, quando os fragmentos eram colocados em placas de petri contendo apenas o meio Sabouraud Dextrosado a 4%, era notada contaminação bacteriana, dificultando o isolamento do *P. insidiosum*. Para solucionar esse problema, o isolamento passou a ser feito inicialmente em placas contendo meio Sabouraud com Clorafenicol e os recultivos a partir do crescimento do crescimento radial notado ao redor dos “kunkers” apenas em meio Sabouraud destrosado, sem antibiótico.

Algumas espécies do Gênero *Pythium* apresentam sensibilidade ao uso de Clorafenicol (CARNES; LEEARY, 1977), no entanto, para isolamento inicial, esse fato não foi observado no presente estudo. Para avaliação de sensibilidade do *P. insidiosum* frente ao uso de Clorafenicol devem ser realizados ensaios de inibição específicos.

Corroborando com dados encontrados por Pires (2012), verificou-se que a aplicação da Anfotericina B sobre as culturas de forma isolada apresentou efeito inibitório parcial quando comparado ao crescimento do grupo controle, tratado apenas com solução fisiológica a 0,9%, principalmente com relação à concentração de 100µL/mL, maior concentração avaliada neste. De acordo com Yolanda e Krajaejun (2020), os resultados contraditórios com relação aos resultados obtidos no tratamento com Anfotericina B *in vitro* não são significativos, uma vez que o mecanismo de ação do fármaco está diretamente relacionado ao ergosterol, que não é sintetizado pelo *P. insidiosum*. Além disso, segundo os mesmos autores, os estudos demonstram respostas positivas no tratamento da pitiose *in vivo* em equinos, no entanto, quando há associação com outros tratamentos, como excisão cirúrgica.

Já as avaliações de citotoxicidade e efeito luminoso, mesmo apresentando valores estatísticos significativos quando comparado o crescimento das culturas tratadas e seus respectivos controles, não apresentou inibição do crescimento das culturas no presente estudo.

A vantagem no uso da terapia fotodinâmica quando comparada a drogas antifúngicas se dá pela dificuldade no desenvolvimento de resistência e variação de susceptibilidade, uma vez que a oxidação tem diversos alvos celulares (STRAKHOVSKAYA *et al.*, 2002).

Nesse trabalho foram utilizadas diferentes concentrações de curcumina em solução de DMSO 10%. A escolha do DMSO para solubilizar a curcumina se dá por ele apresentar características de solvente aprótico polar que solubiliza substâncias insolúveis em água, como ocorre com a curcumina, além de ser este recomendado para avaliação de efeito biológico (SOLEIMANI; SAHEBKAR; HOSSEINZADEH, 2018).

Andrade e colaboradores (2013) propuseram o uso de DMSO a 10%. Nesse estudo, esse solvente demonstrou efetividade na aplicação, uma vez que foi notada a distribuição uniforme sobre todo o fragmento da cultura. Mesmo havendo relatos de inibição por Yolanda e colaboradores (2022) sobre o uso de DMSO para inibição do *P. insidiosum*, a escolha do solvente para este estudo se deu a partir de avaliação prévia aos experimentos aqui realizados, nos quais foram testadas soluções diluídas em glicerina, as quais não apresentaram boa aplicabilidade por não diluir uniformemente a curcumina, nem se distribuir de forma uniforme sobre os fragmentos padronizados das culturas, podendo levar a obtenção de resultados incompatíveis com os efeitos reais da curcumina frente ao agente aqui estudado.

A partir de um estudo *in vitro*, Yolanda e colaboradores (2022) concluíram que o DMSO possuía efeito antimicrobiano contra *P. insidiosum*, sendo este dose-dependente. A ação do fármaco ocorre mediante o aumento da permeabilidade de membrana, alterando a expressão de proteínas na parede celular, além de alterar a atividade enzimática (HAZEN, 2013). No entanto, a metodologia para o ensaio de inibição realizada pelos autores impossibilita a comparação com os dados obtidos no presente estudo, uma vez que as diferentes concentrações de DMSO foram acrescentadas ao meio de cultura ainda quente para posterior plaqueamento e inoculação do agente para então realização da avaliação do crescimento radial. E, nesse trabalho, quando comparado o crescimento radial de culturas tratadas com DMSO 10% (grupo controle) com as concentrações diferentes de curcumina (tratados), o crescimento dos grupos tratados foi diferente significativamente para $p < 0,05$.

O tempo de 20 minutos de pré-irradiação proposto no presente estudo está de acordo com estudos anteriores, nos quais, tanto para curcumina testada na inativação de culturas planctônicas e biofilmes e *Candida spp* (ANDRADE *et al.*, 2013) como para outros fotossensibilizadores testados na inativação de culturas do próprio *P. insidiosum* por PIRES em 2012. Notou-se no presente estudo que o tempo utilizado foi efetivo para a fotoinativação parcial de culturas de *P. insidiosum* frente ao uso do fotossensibilizador curcumina, principalmente, na concentração de 1%, independentemente da densidade energética aplicada, concluindo então que a inativação do *P. insidiosum* frente a curcumina depende também da concentração utilizada.

Neste trabalho, diferentes concentrações de curcumina apresentaram diferença significativa em diferentes tempos de aplicação do led azul, sendo a curcumina a 1% a única concentração a apresentar efeito inibitório nas primeiras vinte e quatro horas, independente da energia aplicada. Esse fato pode sugerir a necessidade de mais de uma aplicação sequencial para a inativação total do agente. Além disso, pôde-se observar que a diferença estatística do crescimento radial independe da energia de led azul aplicada, uma vez que houve diferença significativa ($p < 0,05$) em diferentes tempos aplicados.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o *P. insidiosum* é parcialmente sensível à Anfotericina B e que há inibição do crescimento radial nas primeiras 24 horas após a aplicação da curcumina a 1% em qualquer energia aplicada na terapia fotodinâmica antimicrobiana, no entanto, o crescimento volta a ser visível a partir de 48 horas.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado nesse trabalho sugere o potencial inibitório da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre o crescimento de *Pythium insidiosum*, sugerindo que mais de uma aplicação da curcumina apresenta inibição total do agente, sendo pertinente o teste de todas as concentrações, uma vez que em todas pôde-se notar diferença estatística relevante em diversos tempos de aplicação.

REFERENCIAS

- A MEIRELES, M. C.; RIET-CORREA, F.; H ZAMBRANO, A. F.; ZAMBRANO, M. S.; RIBEIRO, G. A. **Cutaneous pythiosis in horses from Brazil Kutane Pythiose bei Pferden in Brasilien**MYCOSES. [s.l.: s.n.].
- ACKROYD, Roger; KELTY, Clive; BROWN, Nicola; REED, Malcolm. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 74, n. 5, p. 656, 2001. ISSN: 0031-8655. DOI: 10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2.
- AKBIK, Dania; GHADIRI, Maliheh; CHRZANOWSKI, Wojciech; ROHANIZADEH, Ramin. **Curcumin as a wound healing agent**. **Life Sciences**Elsevier Inc., 2014. (1) ISSN: 18790631. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.08.016.
- ANDRADE, Mariana Carvalho; RIBEIRO, Ana Paula Dias; DOVIGO, Livia Nordi; BRUNETTI, Iguatemy Lourenço; GIAMPAOLO, Eunice Teresinha; BAGNATO, Vanderlei Salvador; PAVARINA, Ana Cláudia. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 58, n. 2, p. 200–210, 2013. ISSN: 00039969. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.10.011.
- ARLINGTON HEADLEY, Selwyn; NEVES, Homero; JUNIOR, Arruda. Equine cutaneous pythiosis: a report of four cases-RELATO DE CASO-Pitiose cutânea eqüina: um relato de quatro casos. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 289–292, 2004. ISSN: 0103-8478.
- BABINSKI, Tatiane Patricia; GROSSKO, Douglas; PAULA, Daniel De; TOMINAGA, Tania Toyomi. Uso da curcumina na terapia fotodinâmica antimicrobiana: uma revisão/ Use of curcumin in antimicrobial photodynamic therapy: a review. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 7259–7271, 2022. DOI: 10.34119/bjhrv5n2-286.
- BALTAZAR, Ludmila Matos; KRAUSZ, Aimee E.; SOUZA, Ana Camila Oliveira; ADLER, Brandon L.; LANDRISCINA, Angelo; MUSAEV, Tagai; NOSANCHUK, Joshua D.; FRIEDMAN, Adam J. *Trichophyton rubrum* is inhibited by free and nanoparticle encapsulated curcumin by induction of nitrosative stress after photodynamic activation. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 3, 2015. ISSN: 19326203. DOI: 10.1371/journal.pone.0120179.
- BARBOSA, Viviene Santana. **Efeitos da curcumina na terapia fotodinâmica como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico e suas implicações nos tecidos periodontais: análise microbiológica e morfométrica em ratos**. Piracicaba.
- BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; ARAÚJO JR., J. P.; CANDEIAS, J. M. G.; FRANCO, M. F.; MARQUES, M. E. A.; CAMARGO, R. P.; MARQUES, S. A. **Human Pythiosis, Brazil**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no05/04->.
- BOTTON, Sonia A.; PEREIRA, Daniela I. B.; COSTA, Mateus M.; AZEVEDO, Maria Isabel; ARGENTA, Juliana S.; JESUS, Francielli P. K.; ALVES, Sydney Hartz; SANTURIO, Janio Morais. Identification of *pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 1225–1229, 2011. ISSN: 03438651. DOI: 10.1007/s00284-010-9781-4.
- CALVANO, Tatjana P.; BLATZ, Peter J.; VENTO, Todd J.; WICKES, Brian L.; SUTTON, Deanna A.; THOMPSON, Elizabeth H.; WHITE, Christopher E.; RENZ, Evan M.; HOSPENTHAL, Duane R. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma.

Journal of Clinical Microbiology, [S. l.], v. 49, n. 10, p. 3710–3713, 2011. ISSN: 00951137. DOI: 10.1128/JCM.01209-11.

CAVALHEIRO, Ayrton S.; MABONI, Grazieli; DE AZEVEDO, Maria I.; ARGENTA, Juliana S.; PEREIRA, Daniela I. B.; SPADER, Tatiana B.; ALVES, Sydney H.; SANTURIO, Janio M. In vitro activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 53, n. 5, p. 2136–2138, 2009. ISSN: 00664804. DOI: 10.1128/AAC.01506-08.

CHAFFIN, M. K.; SHUMACHER, J.; MCMULLAN, W. C. Cutaneous pythiosis in the horse. **Dermatology**, [S. l.], v. 11, p. 91–103, 1995.

DA PAZ, Giselle SOuza. **SURTO DE PITIOSE EQUINA E PADRONIZAÇÃO DE qPCR PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE *Pythium insidiosum***. Botucatu.

DA SILVA FONSECA, Anelise Oliveira; DE AVILA BOTTON, Sônia; NOGUEIRA, Carlos Eduardo Wayne; CORRÊA, Bruna Ferraz; DE SOUZA SILVEIRA, Júlia; DE AZEVEDO, Maria Isabel; MARONEZE, Beatriz Persici; SANTURIO, Janio Morais; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer. In Vitro Reproduction of the Life Cycle of *Pythium insidiosum* from Kunkers' Equine and Their Role in the Epidemiology of Pythiosis. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 177, n. 1–2, p. 123–127, 2014. ISSN: 0301486X. DOI: 10.1007/s11046-013-9720-6.

DE COCK, Arthur W. A. M.; MENDOZA, Leonel; PADHYE, Arvind A.; AJELLO, Libero; KAUFMAN, Leo; VOOR SCHIMMELCULTURES, Centraalbureau. ***Pythium insidiosum* sp. nov., the Etiologic Agent of Pythiosis** JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jcm>.

DÓRIA, R. G. S. **TRATAMENTO DA PITIOSE EM MEMBROS DE EQUINOS POR MEIO DE PERFUSÃO REGIONAL INTRAVENOSA COM ANFOTERICINA B**. Jaboticabal.

DOVIGO, Livia N.; PAVARINA, Ana Cláudia; RIBEIRO, Ana Paula D.; BRUNETTI, Iguatemy L.; COSTA, Carlos Alberto De S.; JACOMASSI, Denis P.; BAGNATO, Vanderlei S.; KURACHI, Cristina. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 895–903, 2011. ISSN: 00318655. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x.

DYKSTRA, M. J.; H SHARP, N. J.; OLIVRY, T.; HILLIER, A.; MURPHY, K. M.; KAUFMAN, L.; KUNKLE, G. A. **A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs** *Medical Mycology*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/37/6/427/1009354>.

ESPY, M. J. et al. **Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing**. *Clinical Microbiology Reviews* 2006. (1) ISSN: 08938512. DOI: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006.

FERNANDA, Carla; RODRIGUES-, Lea. Programa De Pós-Graduação Em Farmacologia – Unicamp. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], p. 0–49, 2009.

FERREIRA, Jair Camargo; PIRES, Regina Helena; COSTA, Guilherme Barbosa Da; CARRIJO, Bruna Nonato; GUIOTTO, Francine Gabriela; RODRIGUES, Viviani Silva. The In Vitro Effect of Ozone Therapy Against Equine *Pythium insidiosum*. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S. l.], v. 98, 2021. ISSN: 07370806. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103305.

FONSECA, A. O. S.; PEREIRA, D. I. B.; MAIA FILHO, F. S.; OSÓRIO, L. G.;

MARONEZE, B. P.; VALENTE, J. S. S.; PÖTTER, L.; MEIRELES, M. C. A. In vitro susceptibility of zoospores and hyphae of *pythium insidiosum* to antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 69, n. 6, p. 1564–1567, 2014. ISSN: 14602091. DOI: 10.1093/jac/dku021.

GAASTRA, Wim; LIPMAN, Len J. A.; DE COCK, Arthur W. A. M.; EXEL, Tim K.; PEGGE, Raymond B. G.; SCHEURWATER, Josje; VILELA, Raquel; MENDOZA, Leonel. **Pythium insidiosum: An overview**. **Veterinary Microbiology** 2010. (1–2) ISSN: 03781135. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.07.019.

GALIZA, Glauco J. N.; TOCHETTO, Camila; ROSA, Fábio B.; PANZIERA, Welden; DA SILVA, Taiara M.; CAPRIOLI, Rafaela A.; KOMMERS, Glaucia D. Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais. **Pesq. Vet. Bras.**, [S. l.], v. 34, p. 637–642, 2014.

GONZÁLEZ CH, Héctor E.; TRHEEBILCOK, E. P.; MONTANO, J. A.; LÉON, J. V. **TRATAMIENTO DE LA FICOMICOSIS EQUINA SUBCUTÁNEA EMPLEANDO YODURO DE POTASIO***. [s.l.: s.n.]. ISSN: 0018-8794.

GROOTERS, Amy M.; GEE, Melaney K. **Development of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection and Identification of *Pythium insidiosum*** **J Vet Intern Med**. [s.l.: s.n.].

GROOTERS, Amy M.; WHITTINGTON, Amy; LOPEZ, Mae K.; BOROUGHS, Michelle N.; ROY, Alma F. **Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues** **J Vet Diagn Invest**. [s.l.: s.n.].

HAZEN, Kevin C. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 60–63, 2013. ISSN: 07328893. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.09.002.

IANISKI, Lara Baccarin et al. In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 67–73, 2021. ISSN: 14602709. DOI: 10.1093/mmy/myaa032.

INTARAMAT, Akarin et al. Protein A/G-Based immunochromatographic test for serodiagnosis of pythiosis in human and animal subjects from Asia and Americas. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 641–647, 2016. ISSN: 14602709. DOI: 10.1093/mmy/myw018.

JAEGER, Gayle H.; ROTSTEIN, David S.; LAW, J. Mchugh. **Prostatic Pythiosis in a Dog** **J Vet Intern Med**. [s.l.: s.n.].

KRAJAEJUN, Theerapong et al. **Clinical and Epidemiological Analyses of Human Pythiosis in Thailand**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/>.

LÉVESQUE, C. André; DE COCK, Arthur W. A. M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, [S. l.], v. 108, n. 12, p. 1363–1383, 2004. ISSN: 09537562. DOI: 10.1017/S0953756204001431.

LOHNOO, Tassanee; YINGYONG, Wanta; KUMSANG, Yothin; PAYATTIKUL, Penpan; JATURAPAKTRARAK, Chalisa; LAOR, Chailurkit; AEKPLAKORN, Wichai; KRAJAEJUN, Theerapong. Seroprevalence of anti-*Pythium insidiosum* antibodies in the Thai population. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 57, n. 3, p. 284–290, 2019. ISSN: 14602709. DOI: 10.1093/mmy/myy030.

MACIEL, I. C. F.; SILVEIRA, J. T.; MAIA, C. A.; SOUSA, R. M.; OLIVEIRA, N. J. F.; DUARTE, E. R. Pitiose fatal em equino tratado inicialmente para habronemose cutânea. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 293–297, 2008. ISSN: 1679-9216. Disponível em: www.ufrgs.br/favet/revista.

MENDOZA, Leonel; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. **Infections caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum* Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* from Colombia View project Eyewash Stations in Teaching and Research Laboratories Host Potential Pathogenic Microbiota View project**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/282207830>.

MENDOZA, Leonel; ALFARO, Antonio A. **Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases**. [s.l.: s.n.].

MENDOZA, Leonel; HERNANDEZ, Francisco; AJELLO3, Libero. **Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum***. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jcm>.

MENDOZA, Leonel; PRENDAS, Jorge. **A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum***. [s.l.: s.n.].

MILLEK A N, R. I.; CAMPBELL, D. R. S. F. **CLINICAL OBSERVATIONS ON EQUINE PHYCOMYCOSIS**. [s.l.: s.n.].

PEREIRA, Daniela Isabel Brayer; SANTURIO, Janio Morais; ALVES, Sydney Hartz; ARGENTA, Juliana Siqueira; PÖTTER, Luciana; SPANAMBERG, Andréia; FERREIRO, Laerte. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 5, p. 1168–1171, 2007. ISSN: 03057453. DOI: 10.1093/jac/dkm332.

PEREIRA GONZALES, Fernanda; MAISCH, Tim. **Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections**. **Fungal Biology** 2012. (1) ISSN: 18786146. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.10.001.

PIRES, Layla. Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* – estudo invitro e in vivo. [S. l.], 2012.

RAKICH, Pauline M.; GROOTERS, Amy M.; TANG, Kai Ning. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 262–269, 2005. ISSN: 10406387. DOI: 10.1177/104063870501700310.

REIS, Janildo Ludolf; QUEIROZ DE CARVALHO, Eulógio Carlos; GIRÃO NOGUEIRA, Raimundo Hilton; LEMOS, Luciana Silva; MENDOZA, Leonel. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 289–295, 2003. ISSN: 03781135. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.07.005.

RIVIERRE, Christine; LAPRIE, Caroline; GUIARD-MARIGNY, Olivier; BERGEAUD, Patrick; BERTHELEMY, Madeleine; GUILLOT, Jacques. **Pythiosis in Africa**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: www.cdc.gov/eid.

RODRIGUES, C. A.; LUVIZOTTO, M. C. R. Zigomicose e pitiose cutânea em equinos: diagnóstico e tratamento. **Continuous Education Journal CRMV-SP**, [S. l.], v. 3, p. 3–11, 2000. ISSN: 1516-3326.

SANTURIO, Janio Morais; MONTEIRO, Adriana Bardemaker; LEAL, Alexandre Trindade;

KOMMERS, Glaucia Denise; SILVA DE SOUSA, Renato; CATTO, João Batista. **Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil***Mycopathologia*. [s.l.: s.n.].

SEKHON, S.; PADHYE, A. A.; GARG, A. K. **EUROPEAN JOURNAL OF IN VITRO SENSITIVITY OF PENICILLIUM MARNEFFEI AND PYTHIUM INSIDIOSUM TO VARIOUS ANTIFUNGAL AGENTS***Eur. J. Epidemiol.* [s.l.: s.n.].

SOLEIMANI, Vahid; SAHEBKAR, Amirhossein; HOSSEINZADEH, Hossein. **Turmeric (Curcuma longa) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review**. *Phytotherapy Research* John Wiley and Sons Ltd, 2018. (6) ISSN: 10991573. DOI: 10.1002/ptr.6054.

STRAKHOVSKAYA, M. G.; ZHUKHOVITSKII, V. G.; MIRONOV, A. F.; SEREGIN, A. M.; STRANADKO, E. F.; RUBIN, A. B. Fungicidal Activity of Khlorin Photosensitizers. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 384, p. 155–158, 2002.

SUETH-SANTIAGO, Vitor; MENDES-SILVA, Gustavo Peron; DECOTÉ-RICARDO, Débora; DE LIMA, Marco Edilson Freire. **Curcumin, the golden powder from turmeric: Insights into chemical and biological activities**. *Quimica Nova* Sociedade Brasileira de Química, 2015. (4) ISSN: 16787064. DOI: 10.5935/0100-4042.20150035.

SUZUKI, Isabella Luiz; CARLOS, São. **Viabilização da curcumina natural nanoencapsulada para inativação fotodinâmica**. São Carlos.

THITITHANYANONT, Arunee; MENDOZA, Leonel; LAOTHAMATAS, Jiraporn; SATHAPATAYAVONGS, Boonmee; LOLEKHA, Somsak; AJELLO, Libero. **Use of an Immunotherapeutic Vaccine to Treat a Life-Threatening Human Arteritic Infection Caused by Pythium insidiosum**. [s.l.: s.n.].

THONGSRI, Yordhathai; WONGLAKORN, Lumyai; CHAIPRASERT, Angkana; SVOBODOVA, Lucie; HAMAL, Petr; PAKARASANG, Maitree; PRARIYACHATIGUL, Chularut. Evaluation for the Clinical Diagnosis of Pythium insidiosum Using a Single-Tube Nested PCR. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 176, n. 5–6, p. 369–376, 2013. ISSN: 0301486X. DOI: 10.1007/s11046-013-9695-3.

TROST, M. E.; GABRIEL, A. L.; MASUDA, E. K.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; KOMMERS, G. D. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrointestinal canina. **Pesq. Vet. Bras.**, [S. l.], p. 673–679, 2009.

URQUIZA, Mateus de Carvalho; ANJOS, Anderson da Silva; RIBEIRO, Ana Carolina Bezerra; BORBA, Márcia Socorro da Costa; FILHO, Domingos Urquiza de Carvalho; LAGO, Eliana Campêlo; Comparação da eficácia e efeito residual de duas técnicas de antisepsia pré-operatória das mãos com duas substâncias antissépticas. **R. Interd.**, [S. l.], v. 9, p. 112–120, 2016.

VOLLONO, Laura; FALCONI, Mattia; GAZIANO, Roberta; IACOVELLI, Federico; DIKA, Emi; TERRACCIANO, Chiara; BIANCHI, Luca; CAMPIONE, Elena. **Potential of curcumin in skin disorders**. *Nutrients* MDPI, 2019. (9) ISSN: 20726643. DOI: 10.3390/nu11092169.

YOLANDA, Hanna; KRAJAEJUN, Theerapong. **Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against Pythium insidiosum**. *Heliyon* Elsevier Ltd, 2020. (4) ISSN: 24058440. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03737.

YOLANDA, Hanna; LOHNOO, Tassanee; RUJIRAWAT, Thidarat; YINGYONG, Wanta; KUMSANG, Yothin; SAE-CHEW, Pattarana; PAYATTIKUL, Penpan; KRAJAEJUN, Theerapong. Selection of an Appropriate In Vitro Susceptibility Test for Assessing Anti-*Pythium insidiosum* Activity of Potassium Iodide, Triamcinolone Acetonide, Dimethyl Sulfoxide, and Ethanol. **Journal of Fungi**, [*S. l.*], v. 8, n. 11, 2022. ISSN: 2309608X. DOI: 10.3390/jof8111116.

ZHU, Zhi; TANG, Zhiwen; PHILLIPS, Joseph A.; YANG, Ronghua; WANG, Hui; TAN, Weihong. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, [*S. l.*], v. 130, n. 33, p. 10856–10857, 2008. ISSN: 00027863. DOI: 10.1021/ja802913f.