

## Eficácia da imunoterapia no tratamento de pitiose facial em equino

### Efficacy of Immunotherapy in the Treatment of Facial Horse Pythiosis

Carlos Eduardo Pereira dos Santos<sup>1</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>2</sup>, Janio Morais Santurio<sup>3</sup> & Luiz Carlos Marques<sup>4</sup>

#### ABSTRACT

**Background:** Pythiosis in horses is a proliferative and ulcerative disease that primarily affects the skin and subcutaneous tissue of limbs, thoracic-abdominal region and head. This disease sometimes can also affect limb bones or cause tumoral masses in abdomen. Usually, the cutaneous cases are confused with habronemiasis. The disease is more common in marshy areas, places with formation of slow drainage ponds and aquatic vegetation under high temperatures. The aim of this study was to describe the development of facial lesions in a horse caused by pythiosis in Cuiaba, Mato Grosso, and, additionally to discuss relevant issues regarding the diagnosis, clinical course and response to immunotherapy treatment.

**Case:** One five years old mare of unknown breed, created in property located in the Cerrado region, had a wound on its face difficult to be healed and non-responsive to several treatments based on ivermectin and organophosphate administrated by either topical or systemic via. The animal was assisted on the farm of origin by the veterinary team of the Clinical Medicine sector, of the Veterinary Hospital, Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT). On the occasion of the visit, which occurred 60 days after onset of signs, the animal showed a circular single large lesion, ulcerative with serous discharge on the right part of its face, between the eyes and nostrils. There were some necrotic foci with *sinus*, from which *kunkers* were extracted; a condition compatible with pythiosis. The diagnosis was confirmed by histology, ELISA and PCR.

**Discussion:** Assuming pythiosis from data obtained from the survey and profile of the lesion (secretory aspect, emaciation and presence of *sinus* and *kunkers*), immunotherapy treatment was immediately applied. The advanced clinical aspects and the fact that early diagnosis and treatment are essentials to satisfactory therapeutic response were also taken into consideration for starting the treatment. The remission of signs was achieved after five subcutaneous applications with 14 days between each application. From the second application, it was observed clinical improvement and after 60 days of treatment there was almost complete remission of signs. The signs for a satisfactory response in the injury site followed the order of decreasing secretory aspect, decreasing borders, decrease the itching and bringing the edges together with the formation of a thin layer of crust on the surface. Pythiosis cases with lesions on the face and lower abdomen are commonly confused with habronemiasis by macroscopic and widespread similarity between technicians and attendants, and essential support to the diagnosis through laboratory tests, which in turn are still underutilized. In this case, the authors demonstrated the therapeutic efficacy of immunotherapy as an advantage, considering the possibility of applying it in cases of lesions in areas of difficult surgical access, treatment conditions in the field, with low cost and ease of application. Further studies approaching this alternative therapy are necessary, since side effects have been observed in some cases.

**Keywords:** pythiosis, immunotherapy, diagnosis methods.

**Descritores:** pitiose, imunoterapia, método diagnóstico.

## INTRODUÇÃO

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa do tecido subcutâneo, causada pelo *Pythium insidiosum*, oomiceto zoospórico que acomete várias espécies de animais, inclusive humanos, sendo mais frequentes em equinos [1,9].

Na América do Sul ocorre particularmente em áreas palustres (Figura 1), nas quais equinos permanecem por longos tempos [1,4].



**Figura 1.** Equinos parcialmente submersos no lago com presença abundante de plantas aquáticas, em região com elevadas temperaturas (acima de 30°C em média). Ambiente propício para presença de zoósporos de *Pythium insidiosum*.

As lesões cutâneas distribuem-se mais frequentemente na extremidade distal dos membros e porção ventral da parede abdominal, embora ocorram também na face, provavelmente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos [1,16]. A apresentação da lesão e a característica histopatológica são passíveis de engano no diagnóstico, principalmente com habronemose, devido à semelhança e formação de tecido de granulação exuberante [11,13].

Atualmente, técnicas sorológicas e moleculares foram desenvolvidas, objetivando suporte ao diagnóstico precoce e correto [16,17], incrementando o sucesso terapêutico. Diversos protocolos de tratamento têm sido utilizados, com resultados variáveis, incluindo protocolos exclusivamente clínicos, cirúrgicos ou associação de ambos, que foi apontada por alguns autores como o procedimento mais indicado [3,9,16].

Mesmo assim, há limitações relacionadas à impossibilidade de excisar toda área afetada devido ao envolvimento de estruturas anatômicas profundas que precisam ser preservadas [5,9], além da necessidade de monitoramento pós-operatório incluindo curativos e aplicações diárias de medicamentos. Nessas condições, a

imunoterapia representa uma opção promissora para o tratamento da doença e justifica estudos mais aprofundados para confirmar o seu potencial [15].

Objetiva-se com este relato descrever a eficácia da imunoterapia no tratamento da pitiose facial em equino, no município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

## RELATO DE CASO

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

O animal foi assistido na propriedade de origem, pelo setor de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT). Na ocasião da abordagem, observou-se lesão cutânea única, de formato circular, ulcerada, com diâmetro de 14 cm, na face direita e equidistante entre olhos e narinas. A superfície era úmida e hemorrágica. Pequenos focos necróticos com *sinus* em permeio a lesão eram visibilizados e, ao serem explorados por palpação e pressão digital, expeliam pequenas estruturas firmes, brancoamareladas, facilmente destacáveis, medindo em torno de um a três milímetros, compatível com *kunkers*. Os sinais vitais encontravam-se dentro dos limites normais considerados para a espécie equina.

Foi realizada biópsia incisional, sendo os fragmentos divididos em duas porções: uma conservada em formol a 10% para análise histopatológica de rotina, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Gomori metenamina - nitrato de prata (GMS) [12], e outra a exame molecular de PCR, conservada sob refrigeração, seguida de congelamento.

Adicionalmente, foram colhidas, por venopunção jugular, em tubos com vácuo com e sem anticoagulantes, alíquotas de sangue destinadas a avaliação hematológica e teste imunoenzimático (ELISA) para pitiose [17].

Devido à localização anatômica da lesão e a dificuldade em transportar o animal, optou-se tratar o animal exclusivamente com imunoterapia. Para tanto, utilizou-se aplicação de um frasco de imunoterápico<sup>1</sup> a cada 14 dias, por via subcutânea, com acompanhamento da evolução do caso. Foram aplicadas 5 doses do imunoterápico.

DISCUSSÃO

A imunoterapia foi instituída já na primeira visita pressupondo tratar-se de um caso de pitiose. A partir da segunda aplicação, já confirmada a entidade nosológica por exames complementares, era notável a evolução satisfatória do quadro, ocorrendo o rasamento dos bordos da lesão com relação à pele íntegra e a diminuição das secreções. A cada intervalo de 14 dias, o diâmetro reduzia, com relação ao vistoriado na abordagem inicial,

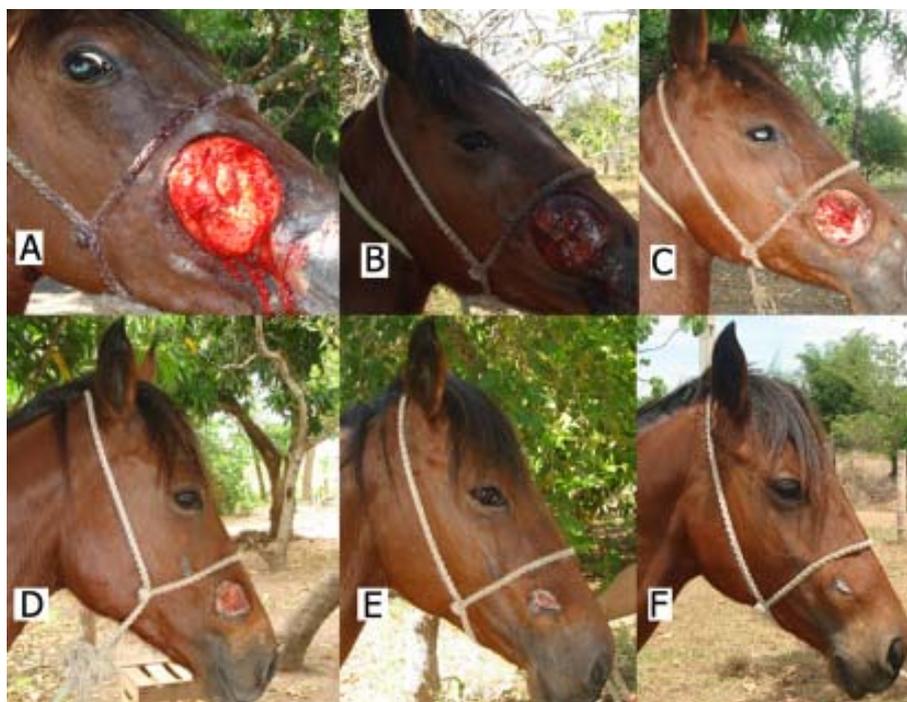
em torno de 15 a 20%. Na última aplicação aproximadamente 85% da área da lesão inicial havia regredido. A cronologia dos eventos e as características evolutivas foram sumarizadas na Tabela 1 e ilustradas na Figura 2. Depois de 45 dias do início do tratamento, houve expressivo ganho de peso do animal e aos 70 dias houve regressão completa, permanecendo apenas uma cicatriz.

No exame histopatológico foram visibilizadas áreas de necrose contendo imagens negativas tubuliformes

**Tabela 1.** Demonstrativo da evolução da lesão relativo a cronologia e aspecto de úlcera decorrente de pitiose facial em uma égua, SRD, 5 anos de idade, submetida a cinco doses seriadas de imunoterapia (Pitium Vac®) pela via subcutânea em 2009, no município de Cuiabá, MT, Brasil.

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

PRES: Presente. DISCR: Discreta. AUS: Ausente. \*relativa a descarga serosanguinolenta. \*\*relativa à superfície da lesão



**Figura 2.** Equino exibindo extensa lesão facial ulcerada decorrente de pitiose no momento da abordagem inicial (A). Nas imagens subsequentes (B-E) as tomadas foram executadas a cada 14 dias, coincidindo com aplicação de imunoterápico (Pitium Vac®), totalizando cinco aplicações. Ao final do tratamento nota-se apenas lesão cicatricial com completa resolução do caso (F).

de hifas ramificadas e irregulares semelhantes a oomicetos do gênero *Pythium*. Além disso, na coloração de Grocott houve impregnação de hifas pela prata. A avaliação molecular (PCR) do tecido e análise sorológica, apresentaram resultados positivos consolidando o diagnóstico. O hemograma demonstrou anemia e leucocitose com neutrofilia.

A suspeita de habronemose é muito difundida entre técnicos e tratadores, principalmente quando a localização da lesão ocorre na face e abdômen inferior. Dada a similitude macroscópica, é essencial subsidiar abordagens clínicas com exames complementares [1,7,12].

Convém lembrar que em casos faciais, comumente a lesão que envolve habronemose parte da terceira pálpebra ou mesmo mantém íntimas relações com junções mucocutâneas, ou seja, normalmente tangenciam canto medial dos olhos. Outros pontos, também, podem ser atingidos como comissura labial e processo uretral. Além disso, a habronemose pode ocorrer em regiões do corpo a partir de ferimentos e escoriações que ocorrem com frequência em áreas que o animal apresenta limitações para espantar moscas vetoras, como regiões distais dos membros e porção ventral do abdômen [11], essas são áreas cutâneas com grande casuística de pitiose, fato que certamente facilita erros de diagnóstico.

Predominam relatos associando-se ocorrência de pitiose às características ambientais de umidade e temperatura elevadas, ou mesmo permanência dos animais em áreas alagadas. Apesar da última assertiva ter sido negada inicialmente pelo proprietário, dada a predominância de área típica de cerrado, verificou-se um microambiente favorável a transmissão da doença, uma vez que em inspeção detalhada notou-se uma pequena lagoa com abundância de vegetação aquática (Figura 1), onde equinos permaneciam parcialmente submersos, importante fator predisponente ao desenvolvimento da pitiose, que favorece a contaminação dos animais pelos zoósporos móveis no ambiente, forma infectante de *Pythium insidiosum* [1,15,16].

A rapidez da evolução da lesão facial, o prurido, as características secretórias, a refratariedade aos tratamentos relatados pelo proprietário e a perda progressiva de condição corporal, a despeito de manutenção do apetite e alimentação adequada, foram constituintes que permitiram nortear a suspeita diagnóstica para pitiose, sabendo que esses sinais clínicos, associados com a

anamnese, já haviam sido citados em outros relatos [4,7]. Adicionalmente, as características da lesão no momento da abordagem foram consistentes para se suspeitar da relação causal, considerando outras descrições na literatura, com ênfase aos *sinus* nos focos necróticos, com presença de *kunkers* [1-4,15].

Como a espécie equina apresenta muita facilidade a formações exuberantes de tecido de granulação, áreas incisionadas, objetivando biópsia podem não contemplar áreas focais de necrose, dificultando diagnóstico [12], por este fato, foram associadas outras técnicas, tais como testes moleculares (PCR) e sorológicos, com a finalidade de determinar precisamente a causa da lesão [4,15,16]. Esses métodos auxiliares de diagnóstico ainda são pouco utilizados, mas sua aplicação deve ser estimulada tanto pela rapidez, quanto pela eficiência.

O diagnóstico e o tratamento precoces são fundamentais para o sucesso da imunoterapia. Por este fato, fora instituído o tratamento já na primeira abordagem a partir da suspeita, enquanto se processavam as amostras para o diagnóstico definitivo. Em casos tardios, é sabido que a eficácia da imunoterapia é inconsistente, tornando os casos pouco responsivos, com sequelas e disfunção, não raramente culminando com óbito do paciente [2,8,15].

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

Anemia e leucocitose com neutrofilia são achados frequentes em doenças debilitantes crônicas, comuns em processos inflamatórios de etiologia fúngica [6,7,14]. A explicação dos efeitos curativos dos imunoterápicos está relacionado ao bloqueio de Th2 e atração de Th1, que por sua vez produz IFN $\gamma$  e IL2 que irão ativar mediadores de células mononucleares composta por linfócitos e macrófagos que danificam e destroem as hifas de *Pythium insidiosum* [16]. A imunoterapia é uma técnica promissora para tratamento da pitiose em equinos, sendo necessários mais estudos para melhor avaliar alguns resultados adversos na resposta dos pacientes tratados.

**Agradecimentos.** A equipe do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV/UFMT) pelo processamento das amostras e a O.C. Freitas Neto, pela revisão do Abstract. Suporte financeiro FAPEMAT processo 002/282/2007. Concessão de bolsa CAPES Programa Prodoutoral.

#### NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>Pitium Vac® Imunoterápico contra pitiose nos equinos, LAPEMI/UFMS e EMBRAPA.

#### REFERÊNCIAS

- 1 Chaffin M.K., Schumacher J. & McMullan W.C. 1995. Cutaneous pythiosis in the horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 11(1): 91-103.
- 2 Frey Jr. F., Velho J.R., Lins L.A., Nogueira C.E.W. & Santurio J.M. 2007. Pitiose equina na região Sul do Brasil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 102(561-562): 107-111.
- 3 Hubert J.D. & Grooters A.M. 2002. Treatment of equine pythiosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 24(10): 812-815.
- 4 Knottenbelt C. & Pascoe R. 1998. Afecções e distúrbios do Cavallo. São Paulo: Manole, 284p.
- 5 Leal A.B.M., Leal A.T., Santurio J.M., Kommers G.D. & Catto J.B. 2001. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21(4): 151-156.
- 6 Lima A.O., Soares J.B., Greco J.B., Galizzi J. & Cançado J.R. 2001. Química do sangue. In: Lima A.O., Soares J.B., Greco J.B., Galizzi J. & Cançado J.R. (Eds). *Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.2.1-2.66
- 7 Lorenzi T.F. 2003. Anemias. In: Lorenzi T.F. (Ed). *Manual de Hematologia, Propedêutica e Clínica*. 3.ed. Rio de Janeiro: MEDSI. pp.193-288.
- 8 Maciel I.C.F., Silveira J. T., Maia C.A., Sousa R.M., Oliveira N.F.J. & Duarte E.R. 2008. Pitiose fatal em equino tratado inicialmente para habronemose cutânea. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(3): 293-297.
- 9 Miller R.I. 1981. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. *Australian Veterinary Journal*. (57): 377-382.
- 10 Miller R.I. & Campbell R.S.F. 1982. Clinical observations on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal*. (58): 221-226.
- 11 Prestes N.C. & Moya C.F. 2008. Habronemose em cavalo: revisão. *Revista Brasileira de Medicina Equina*. (20): 22-28.
- 12 Prophet E.B., Mills, B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 279p.
- 13 Reis Jr. J.L. & Nogueira R.H.G. 2002. Estudo anatomopatológico e imunoistoquímico da pitiose em equinos naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 54(4): 358-365.
- 14 Sacher R.A. & McPherson R.A. 2002. Hematologia. In: Sacher R.A. & McPherson R.A. (Eds). *Interpretação Clínica dos Exames Laboratoriais*. 11.ed. São Paulo: Manole, pp.431-441.
- 15 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2004. Comunicado Técnico n. 34. Ferida da Moda: epidemiologia, diagnóstico, tratamento e experiência com equinos infectados no Pantanal. Corumbá: MAPA, 8p.
- 16 Santurio J.M., Alves S.H., Pereira D.I.B. & Argenta J.S. 2006. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34(1): 1-14.
- 17 Santurio J.M., Leal A.T., Leal A.B.M., Alves S.H., Lübeck I., Griebeler J. & Copetti M.V. 2006. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 26(1): 47-50.

