

## AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Pythium* EM MODELO EXPERIMENTAL

**BEATRIZ PERSICI MARONEZE<sup>1</sup>; CRISTINA ZAMBRANO<sup>2</sup>; CAROLINE QUINTANA BRAGA<sup>3</sup>; ANELISE DE OLIVEIRA DA SILVA FONSECA<sup>4</sup>; VANESSA DAL BEN<sup>5</sup>; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas- RS- beatrizpersici@gmail.com;

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas - RS - cris-zambrano@hotmail.com;

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas- RS - carolineqbraga@hotmail.com;

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - RS- anelise\_fonseca@yahoo.com.br;

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas- RS - nessadalben@hotmail.com;

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas- RS - danielabrayer@gmail.com.

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pythium* agrega várias espécies de oomicetos sapróbios ou patógenos que utilizam ambientes aquáticos para o desenvolvimento de seu ciclo biológico. Até o ano de 2011, *Pythium insidiosum* era a única espécie relatada como patógeno de mamíferos, causando pitiose (MENDOZA et al., 1996). No entanto, os relatos de CALVANO et al. (2011) e FARMER et al. (2015) apontaram *P. aphanidermatum* como uma outra espécie de *Pythium* patógena para o homem.

A pitiose, causada por *P. insidiosum*, possui distribuição mundial, ocorrendo em regiões de clima tropical e subtropical (MENDOZA et al., 1996), destacando-se a Tailândia como endêmica para a pitiose humana e o Brasil para a pitiose equina, especialmente nas regiões do Pantanal Matogrossense (LEAL et al., 2001) e Rio Grande do Sul (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012). A enfermidade é frequente em regiões de campos baixos sujeitas a alagamentos. Na maioria dos casos descritos há histórico de acesso dos animais afetados a ambientes aquáticos, como águas paradas em lagos, açudes e pântanos (CHAFFIN et al., 1995). Este fato é explicado pelo ciclo biológico do *P. insidiosum* que utiliza plantas aquáticas para o seu desenvolvimento e reprodução, onde forma zoósporos infectantes que são atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados, onde se fixam dando início a pitiose (MENDOZA et al., 1996). Embora as formas clínicas da pitiose nas espécies afetadas sejam bem descritas, a patogenia da doença não é completamente entendida, em parte porque as várias tentativas de reprodução experimental da enfermidade nas espécies naturalmente infectadas resultaram em insucesso (MENDOZA et al., 1996). Contudo, MILLER & CAMPBELL (1983) reproduziram pitiose em coelhos ao inocular zoósporos de *P. insidiosum* por via subcutânea. Estudos posteriores empregando a inoculação experimental de *P. insidiosum* em coelhos para avaliar protocolos de terapia da pitiose comprovaram o uso desta espécie como modelo experimental da doença (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2007; 2008, FONSECA et al., 2015).

Como o gênero *Pythium* comprehende mais de 120 espécies que compartilham o mesmo nicho ecológico e como há relatos de outra espécie patógena para mamíferos, além do *P. insidiosum*, torna-se relevante avaliar se outras espécies de *Pythium* que co-habitam o mesmo ecossistema de água doce podem ser patógenas para os animais. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade de espécies de *Pythium* isoladas de ecossistemas de água doce empregando coelhos como modelo experimental.

## 2. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados os seguintes isolados de *Pythium* oriundos de ambientes aquáticos: 01 isolado de *P. pachycaule*; 02 isolados de *P. torulosum*; 03 isolados de *Pythium* spp.; 01 isolado de *P. rhizooryzae*, 01 isolado de *P. catenulatum* e 01 isolado de *P. insidiosum*. Para cada isolado avaliado foram utilizados 02 coelhos sadios, da raça Nova Zelândia, fêmeas, de 3 meses de idade, totalizando 18 animais. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com alimentação diária constituída de ração comercial para coelhos e água *ad libidum*.

O inoculo de zoósporos foi obtido conforme descrito por PEREIRA et al. (2007). Os animais foram inoculados com 1 mL do inoculo por via subcutânea no lado direito da região das costelas e inspecionados diariamente durante 45 dias. A evolução das lesões foi medida a cada 5 dias, no sentido horizontal e transversal ( $\text{cm}^2$ ), com auxílio de paquímetro. Ao final do experimento foi feita a eutanásia e a necropsia dos animais e as lesões coletadas para análise histopatológica. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (processo nº: 23110.003682/2013-93).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais inoculados desenvolveram nódulos subcutâneos pequenos (com tamanhos que variaram de 1  $\text{cm}^2$  a 2  $\text{cm}^2$ ) 20 dias após a inoculação subcutânea na região costal direita. Com exceção dos animais que foram inoculados com o isolado de *P. insidiosum*, as lesões subcutâneas mantiveram-se no mesmo tamanho até o momento da necropsia dos animais, 45 dias após a inoculação. No entanto, os dois animais que foram inoculados com *P. insidiosum* desenvolveram nódulos subcutâneos idênticos à pitiose experimental em coelhos (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2007, FONSECA et al., 2015). Nestes animais, os nódulos subcutâneos após 20 dias de inoculação, apresentavam medidas de aproximadamente 20  $\text{cm}^2$  de área e ao final do experimento mediam 30  $\text{cm}^2$ . A análise macroscópica dessas lesões revelou lesões subcutâneas multilobuladas, endurecidas, branco-rosadas e bastante vascularizadas, similar as previamente descritas por SANTURIO et al. (2003); PEREIRA et al. (2007) e FONSECA et al. (2015). Nos demais animais as lesões estavam firmemente aderidas ao tecido subcutâneo e apresentavam-se como pequenos nódulos, alguns contendo pus em seu interior. Embora CALVANO et al. (2011) e FARMER et al. (2015) tenham relatado infecções subcutâneas no homem por *P. aphanidermatum*, no presente estudo apenas *P. insidiosum* foi capaz de causar pitiose no modelo experimental. Todavia, a patogenicidade de *P. aphanidermatum* em coelhos não foi avaliada neste estudo.

## 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que, dentre as espécies de *Pythium* avaliadas, apenas *P. insidiosum* foi patogênico para coelhos. No entanto, este estudo não está concluído e a patogenicidade de outras espécies de *Pythium* será avaliada, incluindo *P. aphanidermatum*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALVANO TP, BLATZ PJ, VENTO TJ, WICKES BL, SUTTON DA, THOMPSON EH, WHITE CE, RENZ EM, HOSPENTHAL DR. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **J. Clin. Microbiol.** **49:** 3710-3713, 2011.

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

FARMER A.R.; MURRAY C.K.; DRISCOLL I.R.; WICKES B.L.; WIEDERHOLD N.; SUTTON D.A.; SANDERS C.; MENDE K.; ENNISS B.; FEIG J.; GANESAN A.; RINI E.A.; VENTO T.J. Combat-related *Pythium aphanidermatum* Invasive Wound Infection: A Case Report and Discussion of the Utility of Molecular Diagnostics. **J. Clin. Microbiol.**, 2015.

FONSECA A.O.; PEREIRA D.I.; MAIA FILHO F.S.; OSORIO L.G.; MARONEZE B.P.; VALENTE J.S.; POTTER L.; MEIRELES M.C. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **J. Antimicrob Chemother** **69:**1564-1567, 2014.

LEAL, A.B.M. et al. Pitiose eqüina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 21, n. 4, p. 151-156, 2001.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *P. insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale.** v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

MILLER, R.I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia.** v. 81, p. 23-28, 1983.

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

SANTURIO, J.M. et al. Three types of immunotherapics against pythiosis insidiosi developed and evaluated. **Vaccine.** v. 21, p. 2535-2540, 2003.