

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

CAROLINE QUINTANA BRAGA<sup>1</sup>; CRISTINA GOMES ZAMBRANO<sup>2</sup>; CARINA PEREZ SCHOWANTS<sup>3</sup>; CRISTIANE TELLES BAPTISTA<sup>4</sup>; ELISA SIMONE VIÉGAS SALLIS<sup>5</sup>; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas- RS - carolineqbraga@hotmail.com

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

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas-RS - carinaperezmv@gmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas- RS – pequenatellesbaptista@gmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas- RS- esvsallis@yahoo.com.br

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

### 1. INTRODUÇÃO

Oomicetos do gênero *Pythium* são micro-organismos termofílicos, ubíquos em ecossistemas de água doce e solo. Enquanto alguns gêneros de oomicetos são sapróbios, outros são patógenos, podendo causar infecções em plantas (*Pythium* e *Phytophthora*), insetos (*Lagenidium* e *Pythium*), peixes (*Achlya*, *Saprolegnia* e *Pythium*) e mamíferos (*Lagenidium* e *Pythium*) (MENDOZA & VILLELA, 2013). Nestes últimos, *Pythium insidiosum* é a espécie patógena de maior relevância, determinando a pitiose, uma doença emergente, de rápida evolução e difícil tratamento.

A pitiose é uma enfermidade de distribuição mundial, porém sua ocorrência é maior em áreas alagadas e pantanosas de regiões com clima tropical, subtropical e temperado, sendo endêmica em humanos na Tailândia e em equinos no Brasil (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; GAASTRA et al., 2010, LEAL et al., 2001, MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012). As condições ambientais favorecem o desenvolvimento do micro-organismo no ecossistema aquático, uma vez que em seu ciclo biológico, *P. insidiosum* utiliza plantas aquáticas para reprodução assexuada. Nestes ambientes há formação de zoósporos infectantes, que são liberados nas águas e movimentam-se até encontrar outra planta onde completam seu ciclo. Todavia, estes zoósporos também podem ser atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados, onde se fixam e emitem tubos germinativos dando inicio a infecção (MILLER, 1983).

MILLER & CAMPBELL (1983) reproduziram pitiose cutânea em coelhos através da inoculação de zoósporos infectantes. Posteriormente, SANTURIO et al. (2003), PEREIRA et al. (2007) e FONSECA et al. (2015) comprovaram o emprego destas espécie como modelo experimental da enfermidade.

Durante muitos anos *P. insidiosum* foi a única espécie reconhecida como patógeno para mamíferos (De COCK et al., 1987; ALEXOPOULOS et al., 1996; MENDOZA et al., 1996; GAASTRA et al., 2010). Todavia, o relato de dois casos de infecção por *Pythium aphanidermatum*, um patógeno típico de plantas, no homem aponta que outras espécies do gênero podem ter potencial patogênico para mamíferos (CALVANO et al., 2011 FAMER et al., 2015 ).

Como o gênero *Pythium* comprehende mais de 140 espécies que compartilham o mesmo nicho ecológico e considerando o relato de outra espécie

patógena para mamíferos, além de *P. insidiosum*, torna-se importante avaliar se outras espécies de *Pythium* que co-habitam o mesmo ecossistema de água doce são patógenas para os animais.

Este estudo objetivou avaliar a patogenicidade de espécies de *Pythium* isoladas de ecossistemas de água doce empregando coelhos como modelo experimental.

## 2. METODOLOGIA

**Isolados de *Pythium*:** No presente experimento foram utilizados os seguintes isolados de *Pythium* oriundos de ambientes aquáticos: *P. insidiosum* (n=01); *P. catenulatum* (n=01); *P. pachycaule voucher* (n=01); *P. torulosum* (n=02); *Pythium spp* (n=03) e *P. rhizo-oryzae* (n=01). Todos os isolados foram previamente caracterizados por suas características morfológicas através da técnica de zoosporogênese (MENDOZA & PRENDAS, 1988), PCR e sequenciamento de DNA das regiões ITS e COX II, conforme descrito por AZEVEDO et al. (2012).

**Avaliação da patogenicidade em modelo experimental:** Para cada isolado de *Pythium* avaliado foram utilizados dois coelhos, raça Nova Zelândia, fêmeas, três 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*. Os coelhos foram inoculados por via subcutânea no lado direito da região das costelas com um mL de meio de indução contendo aproximadamente 20.000 zoósporos viáveis do isolado de *Pythium* testado, preparados conforme descrito por PEREIRA et al. (2007). Diariamente, durante 45 dias, os animais foram inspecionados e 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 realizou-se a eutanásia e a necropsia dos animais e as lesões foram coletadas para análise histopatológica. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (protocolo nº 3682).

**Análise histopatológica:** fragmentos das lesões foram acondicionados em vidros contendo formol tamponado 10% e enviados ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Veterinária (UFPel). Os fragmentos de tecidos foram incluídos em parafina, cortados em secções de 5 $\mu\text{m}$  e submetidos às colorações de Hematoxilina-Eosina (H&E) e impregnação pela prata (Grocott).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois animais inoculados com *P. insidiosum* desenvolveram nódulos subcutâneos idênticos à pitiose experimental em coelhos, conforme previamente relatadas por SANTURIO et al. (2003); PEREIRA et al. (2007) e FONSECA et al. (2015). Os nódulos subcutâneos, após 20 dias de inoculação, apresentavam medidas de aproximadamente 20  $\text{cm}^2$  de área e ao final do experimento medianam 30  $\text{cm}^2$ . A macroscopia das lesões revelou massas fibrosas subcutâneas e multilobuladas. Ao corte eram firmes, branco-rosadas e bastante vascularizadas. Histologicamente evidenciou-se na derme e tecido subcutâneo áreas multifocais à coalescentes de necrose constituídas por infiltrados inflamatórios, predominantemente de eosinófilos. Nas áreas de necrose observaram-se imagens tubuliformes negativas, referentes às hifas de *P. insidiosum* que se apresentavam rodeadas por áreas irregulares e eosinofílicas, condizentes com reações de Splendori-Hoepli, estando algumas destas reações, delimitadas por células gigantes tipo Langerhans. Observou-se intensa proliferação de tecido

conjuntivo fibroso com presença de eosinófilos, plasmócitos, linfócitos e macrófagos. Na técnica de Grocott foram visualizadas hifas com paredes espessas, marrons, esparsamente septadas e irregularmente ramificadas, localizadas na periferia das áreas de necrose. Lesões similares foram descritas nos estudos realizados por SANTURIO et al. (2003); PEREIRA et al. ( 2007) e FONSECA et al. (2015).

Os animais inoculados com os isolados ambientais, *P. pachycaule voucher*, *P. torulosum*, *Pythium spp.*, *P. rhizo-oryzae* e *P. catenulatum*, desenvolveram nódulos subcutâneos pequenos, com tamanhos que variaram de 1 cm<sup>2</sup> a 2 cm<sup>2</sup>, 20 dias após a inoculação subcutânea e mantiveram-se no mesmo tamanho até o momento da necropsia, 45 dias após a inoculação. As lesões estavam firmemente aderidas ao tecido subcutâneo e apresentavam-se como pequenos nódulos, alguns contendo pus em seu interior. Microscopicamente, as lesões cutâneas (derme profunda) e tecido subcutâneo foram semelhantes, caracterizando-se por piogranulomas multifocais a coalescentes, constituídos por uma área central de necrose, cercadas por quantidade variável de neutrófilos e eosinófilos, íntegros ou degenerados que, por sua vez eram rodeados por macrófagos, células epitelioides, com ocasionais células gigantes. Infiltrado de linfócitos ocorria perifericamente associado ao tecido conjuntivo fibroso neoformado. No Grocott não foram evidenciadas hifas. Estas lesões são condizentes com resposta inflamatória à presença de抗ígenos estranhos ao organismo do hospedeiro. MARTINS et al. (2012).

#### 4. CONCLUSÕES

A reprodução experimental da pitiose com um isolado de *P. insidiosum* de origem ambiental comprova a patogenicidade dessa espécie para mamíferos, bem como confirma que os ambientes pantanosos são a fonte de infecção e mantém o ciclo biológico do oomiceto. Por outro lado, os demais isolados ambientais avaliados *P. catenulatum*, *P. pachycaule voucher*, *P. torulosum*, *P. rhizo-oryzae* e *Pythium spp.* não foram capazes de reproduzir pitiose clínica no modelo experimental evidenciando que, em nossas condições, apenas *P. insidiosum* é patógena para mamíferos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. Chap. 23, p. 683-737.

AZEVEDO, MI, PEREIRA, DIB, BOTTON, AS, COSTA, MM, MAHL, CD, ALVES, SH, SANTURIO, JM. *Pythium insidiosum*: morphological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesqui Vet Bras**. 2012; 32: 619-22.

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.

DE COCK, A.W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 2, p. 344-349, feb.1987.

FARMER, A.R. et al., 2015. Combat-Related *Pythium aphanidermatum* Invasive Wound Infection: Case Report and Discussion of Utility of Molecular Diagnostics. **J Clin Microbiol.** 53:1968-75, 2015.

FONSECA A. O. S. et al. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Vet Microbiol.**, 178:265-9. 2015.

Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L. *Pythium insidiosum*: an overview. **Vet Microbiol.** 2010; 146: 1-16.

LEAL, A. T. et al.; Pitose- Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p. 735-743, jul. 2001.

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

MARTINS, TB; ET al. A Comparative Study of the Histopathology and Immunohistochemistry of Pythiosis in Horses, Dogs and Cattle. **Science Direct. J. Comp. Path.**, Vol. 146, 122e131, 2012.

MENDOZA, L. & PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathol.** 104:59-62, 1988.

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.

MENDOZA, L. & NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *P. insidiosum*. **Medical Mycology**. v. 43, p. 477-486, 2005.

MENDOZA, L; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Curr Fungal Infect Rep.** 7:198–208, 2013.

MILLER, R. I. Investigations into the biology os three ‘phycomycotic’ agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopatologia**. v.81, p. 23-28, 1983.

MILLER, R.I. & CAMPBELL, R.S.F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**. v. 21, p. 331-341, 1983.

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

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.