

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



IMPORTÂNCIA DOS *KUNKERS* NA MANUTENÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO DO OOMICETO *Pythium insidiosum* - RESULTADOS PRELIMINARES

**CORRÊA, Bruna Ferraz¹; PIZONI, Camila²; MENDES, Josiara Furtado¹;
NONNEMACHER, Douglas Vinicius Faccin²; DE OLIVEIRA, Mariana Pires²;
PEREIRA, Daniela Isabel Brayer³.**

¹ Acadêmicos do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: brunafcorrea@gmail.com, ² Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária, ³ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, laboratório de Micologia, Instituto de Biologia-Universidade Federal de Pelotas – Rio Grande do Sul.

INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático, atualmente classificado no Reino Stramenipila, Filo Oomycota, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *Pythium insidiosum*. O gênero apresenta mais de 200 espécies, sendo habitantes do solo e áreas alagadas. Tem grande importância na área agrônoma como patógeno de plantas, podendo causar clorose foliar, apodrecimento de raízes e tombeamento de plântulas (Michereff & Barros, 2001; Miranda & Zottarelin, 2008 *apud* Kirk *et al.*, 2001).

Dentre as várias espécies, apenas *P. insidiosum* é patogênico para mamíferos, uma vez que causa pitiose, uma doença crônica, piogranulomatosa, que acomete animais e humanos (DeCock *et al.*, 1987). É mais frequente na espécie equina nas formas clínicas cutânea e subcutânea (Pereira, *et al.*, 2008). Estes desenvolvem lesões ulcerativas, granulomatosas, de rápido crescimento e difícil tratamento, localizadas nas extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal. No interior da lesão observa-se abundante tecido conjuntivo fibroso entrecortado por massas necróticas semelhantes a corais, chamadas *kunkers*. Estes são constituídos por vasos sanguíneos que sofreram necrose de coagulação e hifas de *P. insidiosum* recobertas por células necróticas (Chaffin *et al.*, 1995; Mendoza, *et al.*, 1996), sendo formados apenas em eqüinos.

Nas infecções por *P. insidiosum* comumente observa-se que os animais afetados permanecem por longos períodos em contato com águas paradas em lagos, açudes ou locais inundados (Chafin *et al.*, 1995). Como *P. insidiosum* é um microrganismo essencialmente aquático, é sugestivo que os zoósporos desempenhem o papel de propagadores do agente, sendo liberados periodicamente em águas pantanosas (Mendoza, 1987). Segundo Miller (1983) o ciclo biológico deste oomiceto se baseia na colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do microrganismo, formando os zoosporângios. Os zoósporos liberados ficam livres na água movimentando-se até encontrar uma nova planta, onde se encistam e emitem tubos germinativos, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo. *In vitro*, é possível reproduzir-se o ciclo do microrganismo quando pequenos pedaços de folhas de grama infectados

pelo oomiceto são transferidos para uma solução de sais minerais e incubados a 37°C por 24-48 horas (Mendoza & Prendas, 1988). Os *kunkers* formados nas lesões de eqüinos provavelmente atuam na manutenção do microrganismo nas águas, uma vez que a partir deles forma-se um novo micélio. Porém, estudos que comprovem tal achado e que avaliem a importância dessas estruturas na epidemiologia da pitiose eqüina não são descritos.

O objetivo do presente trabalho é avaliar a importância dos *kunkers* na manutenção do ciclo biológico do *P. insidiosum* utilizando-se a técnica da zoosporogênese *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras utilizadas foram obtidas de três eqüinos com pitiose. Os *kunkers* foram coletados diretamente das lesões, acondicionados em placas de Petri e transportadas ao Laboratório de Micologia (Instituto de Biologia) em temperatura ambiente. Pequenos fragmentos de *kunkers* previamente lavados em solução de antibióticos foram transferidos para placas de Petri contendo 30 mL de uma solução de sais minerais (meio de indução) constituída por 0,5 mL da solução A [K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$ em 500 mL de água destilada estéril] e 0,1 mL da solução B [$MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2$ em 250 mL de água destilada estéril] em 1000 mL de água destilada estéril. Juntamente com o meio de indução foram distribuídos pedaços de grama (*Paspalum notatum*) cortados em 3 cm, previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos. As placas foram incubadas a 37°C por 96 horas. Após a incubação, as gramas foram regularmente observadas, através de microscopia ótica (40X, 100X, 400X) entre lâmina e lamínula nos seguintes períodos: a cada hora, nas primeiras 8 horas de incubação; e posteriormente, a cada 12 horas. Na avaliação consideraram-se os parâmetros: período de formação de zoosporângios; produção e avaliação da motilidade dos zoósporos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras analisadas, nas primeiras 3 horas de incubação observou-se crescimento micelial nas gramas e entumescimento na extremidade de algumas hifas. Posteriormente iniciou-se o processo de formação dos zoosporângios, verificando-se que o pequeno entumescimento na extremidade da hifa aumentava progressivamente, até assumir a forma de uma pequena vesícula com nítida visualização de fluxo citoplasmático. A formação dos zoosporângios foi evidenciada pelo completo preenchimento da vesícula e posterior diferenciação que culminou na formação dos zoósporos. Estes apresentavam movimentos rápidos de seus flagelos, resultando na ruptura da membrana do zoosporângio. Os zoósporos liberados apresentavam formas ovóides, com presença de dois flagelos e, uma vez livres, nadavam em diferentes direções por meio de movimentos de rotação em torno de seu próprio eixo. Antes de sofrer o encistamento, nadavam lentamente até a parada completa dos movimentos; tornavam-se globosos e emitiam tubos germinativos que formavam longos filamentos. Análises similares foram feitas por Mendoza & Prendas (1988) e Pereira *et al.* (2008) ao avaliar a zoosporogênese em cultivos de *P. insidiosum*. Nas 3 amostras verificou-se que o processo de formação dos zoosporângios e zoósporos foi evidente a partir de 8 horas de incubação. Entretanto, verificaram-se diferenças nas amostras estudadas. Na amostra 1 houve formação de poucos zoosporângios e zoósporos com baixa motilidade que se

mantiveram até as 24 horas. Já nas amostras 2 e 3 a formação dos zoosporângios e zoósporos foi abundante em 8 horas de incubação, em seguida foi declinando, mas se mantendo até às 48 horas. Em 72 e 96 horas de incubação, nas 3 amostras avaliadas somente foram visualizados zoósporos encistados emitindo tubos germinativos. Neste estudo observou-se que em 2 amostras, a produção de zoósporos manteve-se ativa até 48 horas de incubação. Estes resultados diferem daqueles obtidos por Pereira *et al* (2008) que observaram a formação de zoósporos por 24 horas. Entretanto, ainda não se dispõem de dados suficientes para explicar tais diferenças. As poucas amostras utilizadas se devem ao fato que as análises iniciaram-se no mês de maio, período em que diminui a ocorrência dos casos de pitiose eqüina. Desta forma, torna-se necessário complementar-se este estudo com um número maior de amostras para verificar tais achados.

CONCLUSÕES

Até o momento foram testadas poucas amostras, entretanto, todos os *kunkers* observados apresentaram a habilidade de gerar zoósporos. Isto sugere que estas estruturas aos serem desprendidas das lesões dos eqüinos e caindo em ambientes alagados atuam na manutenção do ciclo biológico do agente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARQUES, S. A. *et Al.* ***Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v.81, n.5, p. 483-485, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abd/v81n5/v81n05a12.pdf>>. Acesso em: 12 ago 2009.
- MENDOZA, L. *et Al.* **Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*.** Journal of Clinical Microbiology, v.31, n. 11, p.2967-2973, 1993.
- MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável.** Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. ISBN 85-87459-06-6, 368 p.
- MIRANDA, M L. de; ZOTTARELIN, C. L. A. P. **O gênero *Pythium* no Parque Estadual da Serra da Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil.** Hoehnea, v. 35, n. 2, p.281-288, 2008. Disponível em: <[http://www.ibot.sp.gov.br/HOEHNEA/Hoehnea35\(2\)artigo09.pdf](http://www.ibot.sp.gov.br/HOEHNEA/Hoehnea35(2)artigo09.pdf)>. Acesso em: 12 ago 2009.
- PEREIRA, D. I. B. **Susceptibilidade in vitro e in vivo de *Pythium insidiosum*: Estudo comparativo entre caspofungina e imunoterapia em coelhos.** 2008. Tese. Doutor em Ciências Veterinárias/ Microbiologia/ Micologia- Faculdade de Veterinária- UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 2008.
- PEREIRA, D. I. B., *et Al.* **Zoospogênese in vitro entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*.** Ciência Rural, v.38, n.1, p.143-147, Santa Maria, 2008.