

IMPORTÂNCIA DO “KUNKER” NO CICLO BIOLÓGICO DA PITIOSE

**FONSECA, Anelise Oliveira da Silva¹; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer²;
VALENTE, Julia de Souza Silvera³, CORREA, Bruna Ferraz³, MEIRELES,
Mario Carlos Araujo⁴**

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária – UFPel – anelise_fonseca@yahoo.com.br

²Prof. Adjunto- Departamento de Microbiologia – UFPel

³Graduanda em Biologia - UFPel – Bolsista de Iniciação Científica

⁴Prof. Associado – Departamento Veterinária Preventiva – UFPel - meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pythium* possui mais de 120 espécies conhecidas, sendo a maioria de importância fitopatogênica e causando grandes perdas econômicas na agricultura (ALEXOPOULOS, 1996). Dentre as espécies, apenas *Pythium insidiosum* é patógeno para mamíferos. É um microrganismo que requer ambiente aquático para desenvolver seu ciclo biológico que se inicia pela colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do micélio formando os zoosporângios. Os zoósporos liberados ficam livres na água movimentando-se até encontrar outra planta, dando origem a um novo micélio onde completam seu ciclo. A pitiose ocorre quando os zoósporos são atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados, onde se fixam e emitem tubos germinativos (MILLER, 1983). Comumente, observa-se que os animais afetados permanecem por longos períodos em contato com águas paradas em lagos, açudes ou locais pantanosos (CHAFIN *et al.*, 1995).

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, (GAASTRA *et al.*, 2010), em áreas alagadiças ou com histórico de inundação e temperaturas médias de 25°C (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). No mundo, o Pantanal brasileiro provavelmente é o local de maior frequência de pitiose equina (MENDOZA *et al.*, 1996; LEAL *et al.*, 2001). Apesar de não se ter dados completos sobre a incidência da pitiose no Brasil, esta representa um grande problema na criação de eqüinos (LEAL *et al.*, 2001).

Casos esporádicos da enfermidade têm sido relatados em bovinos, felinos, ovinos, aves e espécies selvagens mantidas em cativeiro, como jaguar, urso e camelo (SANTURIO *et al.*, 2006). Em humanos, é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum no sudeste da Ásia (KRAJAEJUN *et al.*, 2006). Os caninos são uma a segunda espécie mais afetada pela pitiose, geralmente acometidos na forma gastrointestinal (LEAL *et al.*, 2001).

A espécie equina é a mais acometida pela doença apresentando-se geralmente na forma cutânea e/ou subcutânea. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de granulomas eosinofílicos de difícil tratamento, com presença de *kunkers* (MILLER & CAMPBELL, 1982; MEIRELES *et al.*, 1993). Estas estruturas são formadas por hifas de *P. insidiosum* cobertas por células necróticas que originam massas que se assemelham a corais, de forma irregular, ramificadas e aspecto arenoso (LEAL *et al.*, 2001; MEIRELES *et al.*, 1993) que se despreendem das lesões.

Os *kunkers* podem ser importantes na manutenção do ciclo epidemiológico da pitiose, mantendo a presença do oomiceto na água, uma vez que a partir destas estruturas pode haver a formação de novos micélios. Estudos que avaliem a importância do *kunker* na manutenção do ciclo biológico de *P.*

insidiosum e conseqüentemente na epidemiologia da pitiose não são descritos na literatura.

O presente trabalho tem como objetivo reproduzir *in vitro* o ciclo biológico do *P. insidiosum* a partir de *kunkers* e determinar a importância destas estruturas na epidemiologia da pitiose equina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No período de março de 2009 a maio de 2011 foram coletadas 15 amostras de *kunkers* obtidas de equinos com pitiose. Imediatamente após coleta, os *kunkers* eram enviados ao Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas para processamento. No laboratório, os *kunkers* eram cortados em pequenos fragmentos com o auxílio de bisturi esterilizado e lavados em solução de antibiótico por três vezes. Posteriormente dez fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio de indução, juntamente com pequenos pedaços de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos. Estas placas ficavam incubadas em estufa a 37°C por 72 horas. Durante este período os fragmentos de grama eram observados em microscópio ótico, a cada três horas nas primeiras oito horas de incubação e posteriormente a cada doze horas. Durante este período foram avaliados o parasitismo da grama por hifas, formação de zoosporângios e liberação de zoósporos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 15 amostras testadas, 13 nas primeiras oito horas apresentaram parasitismo na grama observando-se o crescimento de hifas. Dentro das primeiras 24 horas as hifas apresentaram extremidades entumecidas com posterior formação de zoosporângio. No interior destas estruturas era possível se observar a formação de zoósporos, que através de movimentos rápidos de seus flagelos causavam a ruptura da membrana do zoosporângio. Os zoósporos liberados apresentavam forma ovóide, evidenciando a presença de dois flagelos. Uma vez livres no meio de indução, nadavam em diferentes direções por meio de movimentos de rotação em torno de seu próprio eixo. A quantidade de zoósporos formada, assim como, sua motilidade variou entre as amostras analisadas. Em 40% (6) das amostras verificou-se liberação de zoósporos em 24 horas e em 47% (7) em 48 horas. Duas amostras (13%) não apresentaram crescimento. Acredita-se que este achado seja devido ao fato de que estas amostras eram provenientes de animais que estavam sendo submetidos ao tratamento com imunoterápico Pitium-Vac antes da coleta dos *kunkers*. Entretanto, para afirmarmos tal achado, outros estudos deverão ser realizados com um maior número de amostras nas mesmas condições. Nas observações realizadas às 72 horas não houve incremento na produção de zoósporos. Estudos avaliando a produção de zoósporos e a manutenção do ciclo de vida do *P. insidiosum* a partir de *kunkers* de equinos liberados em ambientes aquáticos não são descritos. Todavia, estudos *in vitro* determinando o tempo de zoosporangênese a partir de cultivos deste oomiceto demonstram que este processo tem início a partir de 3 horas de incubação a 37°C, com o pico de produção de zoósporos entre 6 e 8 horas (MENDOZA & PRENDA, 1988; PEREIRA et al, 2008). No presente estudo observou-se que a maior produção de zoósporos situou-se entre 24 e 48 horas.

Sugere-se que o menor tempo de zoosporogênese relatado por esses autores tenha ocorrido porque nesses experimentos o processo foi induzido a partir de gramas previamente parasitadas por *P. insidiosum*. Em condições naturais, *kunkers* são desprendidos das lesões, caem em ambientes aquáticos, dando início ao ciclo de reprodução assexuada de *P. insidiosum*. Acredita-se que os achados encontrados no presente estudo, onde se utilizou *kunkers* para induzir a zoosporogênese e reproduzir o ciclo biológico de *P. insidiosum in vitro*, reflete com maior fidedignidade o que ocorre em condições naturais.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos evidenciam a importância dos *kunkers* na manutenção do ciclo biológico do *P. insidiosum* em ambientes aquáticos que atuam como fontes de infecção para animais sadios. Sendo assim, medidas preventivas da enfermidade poderão incluir a restrição do acesso de animais doentes a aguadas, juntamente com eqüinos sadios.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A.; DE COCK, A. W. A. M.; EXEL, T. K.; PEGGE, R. B. G.; SCHEURWATER, J. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, n.1-2, p.1- 16, 2010.

KRAJAEJUN, T.; SATHAPATAYAVONGS, B.; PRACHARKTAM, R.; NITIYANANT, P.; LEELACHAIKUL, P.; WANACHIWANAWIN, W. et al. Clinical and Epidemiological analyses of human Pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**. v. 43, n.5, p.569 – 576,2006.

LEAL, A.T.; LEAL, A.B.M.; FLORES, E.F.; SANTURIO, J.M. Pitiose – Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**. v. 31, n. 4, p. 735-743, 2001.

MEIRELES, M.C.A.; RIET-CORREA, F.; FISCHMAN, O.; ZAMBRANO, A.F.H.; ZAMBRANO, M.S.; RIBEIRO, G.A. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**. v. 36, n. 3-4, p. 139-142, 1993.

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

MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**. v. 104, n.1, p. 59-62, 1988.

MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, n.6 p. 221-226, 1982.

MILLER, R.I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**. v. 81,n.1, p. 23-28, 1983

PEREIRA, D. I. B.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; CAVALHEIRO, A.S.; FERREIRO, L. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados de oomicetos *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**. v. 38, n. 1, p. 143-147, 2008.

SANTURIO, J.M., ALVES, S.H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTA, J.S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006.