

## Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*

### *In vitro* zoosporogenesis among oomycetes *Pythium insidiosum* isolates

Daniela Isabel Brayer Pereira<sup>1\*</sup> Janio Morais Santurio<sup>II</sup> Sydney Hartz Alves<sup>II</sup>  
Juliana Siqueira Argenta<sup>I</sup> Ayrton Sydnei Cavalheiro<sup>II</sup> Laerte Ferreira<sup>III</sup>

#### RESUMO

*Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático, responsável pela etiologia da pitiose, uma enfermidade crônica, observada frequentemente em eqüinos. A produção de zoósporos móveis por este microrganismo se constitui no fator determinante da ocorrência da enfermidade. Este estudo avaliou a zoosporogênese e quantificou a produção de zoósporos de 32 amostras de *Pythium insidiosum* isoladas de eqüinos naturalmente infectados. *Pythium insidiosum* foi cultivado em meio Corn Meal Agar acrescido de fragmentos de grama, durante 5 dias, a 37°C. Posteriormente, os fragmentos de grama parasitados foram incubados em Meio de Indução a 37°C, por 24 horas. Observou-se que 16 amostras (50%) produziram 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>, 12 isolados (37,5%) produziram acima de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>, enquanto quatro amostras (12,5%) produziram menos de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>. O período de maior produção de zoósporos foi entre 6 e 8 horas de incubação. O protocolo utilizado na indução da zoosporogênese mostrou-se eficiente e representa uma importante ferramenta, tanto para a identificação do *Pythium insidiosum*, como para a obtenção de zoósporos em quantidades suficientes para a inoculação em animais experimentais e aplicação no desenvolvimento de testes de suscetibilidade.

**Palavras-chave:** *Pythium insidiosum*, zoosporogênese, zoósporos, oomiceto, pitiose.

#### ABSTRACT

*Pythium insidiosum* is an aquatic oomycete and the etiology of a chronic disease called pythiosis, commonly found in the skin of horses. The production of mobile zoospores by this microorganism is the determinant factor of this disease. This study evaluated the zoosporogenesis and quantification of zoospores in 32 samples of *Pythium insidiosum* isolated from

horses with pythiosis. The assay used culture of the *Pythium insidiosum* in Corn Meal Agar plus grass blades for 5 days at 37°C. The grass blades were incubated in Induction Medium at 37°C for 24 hours. The findings showed 16 samples (50%) yielded 20,000 zoospores mL<sup>-1</sup>, 12 (37.5%) samples yielded over 20,000 zoospores mL<sup>-1</sup> and 4 samples (12.5%) yielded less than 20,000 zoospores mL<sup>-1</sup>. The zoospores production was higher between 6 and 8 hours of incubation. The protocol used in the zoosporogenesis induction was efficient and represents an important tool for *Pythium insidiosum* identification and the attainment of zoospores in adequate amounts for inoculation in experimental animals and application in the development of susceptibility tests.

**Key words:** *Pythium insidiosum*, zoosporogenesis, zoospores, oomycete, pythiosis.

#### INTRODUÇÃO

*Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático, classificado no Reino *Stramenopila*, Phylum *Oomycota*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* e Espécie *insidiosum*. Esse gênero apresenta mais de 200 espécies, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas (ALEXOPOULOS et al., 1996). Apenas *Pythium insidiosum* é patogênico para mamíferos, uma vez que causa pitiose, uma doença crônica, piogranulomatosa, que acomete animais e humanos (De COCK et al., 1987).

A pitiose é mais freqüente na espécie eqüina, manifestando-se principalmente nas formas

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. \*Endereço para correspondência: Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 20, sala 4139, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Fone-fax: (055) 32208906. E-mail: danielabrayer@yahoo.com.br.

<sup>II</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>III</sup> Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

clínicas cutânea e subcutânea. Nestes animais, observa-se o desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, de crescimento rápido e difícil tratamento, localizadas, predominantemente, nas extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal. A presença de massas necróticas semelhantes a corais, denominadas *kunkers*, é característica da enfermidade nos eqüinos (MILLER & CAMPBELL, 1982; MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELLES et al., 1993; MENDOZA et al., 1993). Já, nas demais espécies, os *kunkers* não são observados e a doença se manifesta, principalmente, nas formas cutânea e gastrointestinal em caninos e felinos (GROOTERS, 2003; RAKICH et al., 2005), e subcutânea em bovinos e ovinos (SANTURIO et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; TABOSA et al., 2004). Nos últimos anos, é crescente o número de relatos de pitiose em espécies não-domésticas como urso, jaguar, camelo e tigre (GROOTERS, 2003; CAMUS et al., 2004; WELLEHAN et al., 2004; BUERGELT et al., 2006). Em humanos, é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum na Tailândia (IMWIDTHAYA, 1994; KRAJAEJUN et al., 2006). Porém, casos de pitiose humana também têm sido descritos em outros países, inclusive no Brasil (PRASERTWITAYAKIJ et al., 2003; BOSCO et al., 2005).

Segundo MILLER (1983), a presença de áreas alagadas, vegetação abundante e temperatura ambiental superior a 15 - 20°C constituem as condições ideais para o desenvolvimento de *Pythium insidiosum*. Nessas situações, há a produção de zoósporos móveis, biflagelados, responsáveis pela infecção em mamíferos. Acredita-se que os zoósporos livres nas águas sejam atraídos para a pele dos animais, onde se encistam, iniciando a infecção cutânea. A enfermidade ocorre em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, tendo sido relatada em países como Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos, Haiti, Índia, Indonésia, Japão, Nova Zelândia, Papua-Nova Guiné, Tailândia, Venezuela e África (MENDOZA et al., 1996; PÉREZ et al., 2005; RIVIERRE et al., 2005). Embora não exista um levantamento preciso da prevalência da enfermidade no Brasil, a pitiose representa um problema à eqüinocultura, especialmente em regiões alagadiças como o Pantanal Matogrossense (LEAL et al., 2001).

O diagnóstico presuntivo de pitiose é realizado levando-se em consideração a epidemiologia, sinais clínicos e aspectos macro e microscópicos das lesões. O isolamento e identificação do agente são de grande valor para o diagnóstico definitivo e diferencial, embora, atualmente, métodos sorológicos e moleculares constituam poderosas ferramentas para o diagnóstico precoce e preciso de pitiose (SANTURIO et al., 2006).

ALEXOPOULOS et al. (1996) e MOORE-LANDECKER (1996) afirmam que, para realizar-se a correta identificação do *Pythium insidiosum*, é necessário observar-se as características morfológicas dos zoosporângios, zoósporos, oogônia e anterídio. Para isto, é preciso a obtenção de zoósporos em laboratório, utilizando-se a técnica de zoosporogênese em meio líquido descrita por MENDOZA & PRENDAS (1988). A obtenção das estruturas infectantes é importante para o desenvolvimento de estudos *in vitro* de suscetibilidade a drogas e reprodução experimental da enfermidade em coelhos, somente possível pela inoculação subcutânea de água rica em zoósporos produzidos *in vitro* (MILLER & CAMPBELL, 1983; SANTURIO et al., 2003). Sendo assim, a utilização de protocolos de indução da zoosporogênese em *Pythium insidiosum* é ponto crucial nos estudos que envolvem este oomiceto. Apenas MENDOZA & PRENDAS (1988), CHAIPRASERT et al. (1990) e SANTURIO et al. (2003) relataram detalhadamente a metodologia de indução de zoosporogênese.

O protocolo de indução da zoosporogênese em *Pythium insidiosum* utilizado no presente trabalho foi baseado na técnica descrita por MENDONZA & PRENDAS (1988) e teve por objetivos induzir a zoosporogênese de 32 isolados de *Pythium insidiosum* e avaliar a produção de zoósporos, com o intuito de utilizá-los na reprodução experimental da enfermidade e no desenvolvimento de testes de suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 32 amostras de *Pythium insidiosum*, isoladas de eqüinos naturalmente infectados, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul e do Mato Grosso do Sul (Pantanal) e duas amostras padrão ATCC 58637 e CBS 101555, mantidas na coleção de microrganismos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

As amostras de *Pythium insidiosum* previamente cultivadas em *Corn Meal Agar* (CMA) foram repicadas para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultivo, juntamente com fragmentos de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos. As placas foram incubadas por um período de 5 dias à temperatura de 37°C. Após esse período de cultivo, os fragmentos de grama parasitados pelo *Pythium insidiosum* foram transferidos para uma placa de Petri contendo 30mL de Meio de Indução, composto pela solução A: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0 M), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 M), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3,66 M), e pela solução B:

MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O (0,5 M), CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O (0,5 M). O Meio de Indução era obtido pela mistura de 0,5mL da solução A e 0,1mL da solução B em 1.000mL de água destilada estéril. As placas de Petri contendo o Meio de Indução juntamente com a grama infectada eram incubadas a 37°C, por 24 horas. Durante esse período, os fragmentos de grama foram regularmente observados, através de microscopia óptica (100 e 400 X) entre lâmina e lamínula. Nas primeiras 12 horas de incubação, as avaliações foram feitas em intervalos de 1 hora e a partir da 12<sup>a</sup> hora em intervalos de 6 horas. Após observação da formação de zoosporângios e liberação dos zoósporos, realizou-se a contagem de zoósporos livres no Meio de Indução, utilizando-se hemocitômetro de Neubauer (SANTURIO et al., 2003).

## RESULTADOS

Nas primeiras três horas de incubação no Meio de Indução, observou-se um entumescimento na extremidade de algumas hifas. A partir dessa observação, podia-se acompanhar 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. Durante este processo era possível a nítida visualização de fluxo citoplasmático dirigindo-se do interior da hifa para a vesícula. Após o completo preenchimento da vesícula, iniciava-se um processo de diferenciação no seu interior que culminava com a formação dos zoósporos. Estes se caracterizavam pelos movimentos rápidos de seus flagelos, o que resultava na ruptura da membrana do zoosporângio com liberação dos zoósporos no Meio de Indução. 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, permanecendo ativos por aproximadamente 15 minutos. Antes de sofrer o encistamento, nadavam lentamente até a parada completa de movimentos, tornando-se, então, globosos. Após alguns minutos, os zoósporos encistados emitiam tubos germinativos que formavam longos filamentos após 24 horas de incubação a 37°C. Todo o processo da zoosporogênese, desde a diferenciação da hifa até a liberação dos zoósporos, requeria, aproximadamente, 35 a 40 minutos.

Embora zoósporos tenham sido observados já nas primeiras 3 horas de indução, constatou-se que o maior número foi produzido entre 6 e 8 horas de incubação. A partir de 9 horas de incubação, a quantidade de zoósporos diminuía gradativamente até

a 24<sup>a</sup> hora, observando-se apenas zoósporos encistados emitindo tubos germinativos, mas sem a formação de novos zoosporângios.

Das 32 amostras de *Pythium insidiosum* estudadas, observou-se que 16 isolados (50%) produziram 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>, 12 isolados (37,5%) produziram acima de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup> (variando de 22.500 a 107.500 zoósporos mL<sup>-1</sup>), enquanto que quatro amostras (12,5%) produziram menos de 20.000 zoósporos mL<sup>-1</sup> (5.000 a 10.000 zoósporos mL<sup>-1</sup>). Observou-se, também, que os isolados de *Pythium insidiosum* de obtenção mais recente apresentaram elevado número de zoósporos.

## DISCUSSÃO

Todos os isolados de *Pythium insidiosum* avaliados apresentaram a habilidade de gerar zoósporos, demonstrando que o protocolo utilizado é eficiente para a identificação do microrganismo. Desta forma, pode-se inferir que o presente protocolo também pode ser utilizado para obtenção de zoósporos em número suficiente para reprodução da enfermidade em animais experimentais e realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos. SANTURIO et al. (2003) reproduziram experimentalmente a doença em coelhos utilizando 17.500 zoósporos viáveis mL<sup>-1</sup>. Já para a obtenção de inóculo de *Pythium insidiosum* para uso em testes de suscetibilidade *in vitro*, estudos em andamento estimam que o número ideal de zoósporos situe-se entre 20.000 e 30.000 mL<sup>-1</sup> (ALVES, 2006 – informe pessoal).

MENDOZA & PRENDAS (1988) citam que o protocolo para indução de zoosporogênese deve ser baseado em alguns aspectos como: parasitismo de fragmentos de grama em um meio pobre em nutrientes, seguido da incubação em um Meio de Indução contendo íons Ca<sup>2+</sup> (cálcio), Mg<sup>2+</sup> (magnésio) e K<sup>+</sup> (potássio) com temperatura e pH adequados. A importância desses íons na zoosporogênese foi relatada por SHIPTON (1987) ao demonstrar que tanto a liberação dos zoósporos quanto a sua motilidade foi influenciada pelas concentrações de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> no Meio de Indução. Segundo SHIPTON (1985) e MENDOZA & PRENDAS (1988), a quantidade de zoósporos produzidos, assim como os tempos de incubação são dependentes do meio utilizado para crescimento do *Pythium insidiosum* antes do processo de indução, da zoosporogênese. Em um estudo realizado com nove isolados de *Pythium insidiosum*, observou-se que o número máximo de zoosporângios e zoósporos foram obtidos após uma hora e meia de incubação em Meio de Indução a 37°C, quando utilizou-se o cultivo prévio com grama em água a 2%, por

24 horas, a 37°C. Já quando o cultivo em fragmentos de grama foi realizado em outros meios como Sabouraud dextrose agar (SDA) e CMA, o tempo de incubação foi de quatro dias a 37°C e o período de maior produção de zoosporângios e zoósporos no Meio de Indução ocorreu após 5 horas e meia de incubação a 37°C (MENDOZA & PRENDAS, 1988). No presente trabalho, foi utilizado o meio de CMA para o cultivo de *Pythium insidiosum* em fragmentos de grama, pois a maioria dos isolados testados não apresentaram crescimento em ágar água a 2%. No CMA, observou-se ótimo crescimento no quinto dia de incubação a 37°C. Quando realizada a indução da zoosporogênese, observou-se que o número máximo de zoósporos foram obtidos entre 6 e 8 horas de incubação a 37°C, sendo estes resultados similares aos anteriormente relatados. Embora SHIPTON (1985) afirme que a presença de hifas jovens é o fator determinante para a abundante formação dos zoósporos e que o período prévio de crescimento considerado ótimo para a produção de zoósporos encontra-se entre 24 e 30 horas de incubação, observou-se, nas condições do presente estudo, ausência de crescimento do *Pythium insidiosum* no referido período. Este fato pode ser devido à idade das amostras utilizadas, pois a maioria delas havia sido isolada há alguns anos e vinham sendo repicadas, repetidamente, para manutenção, necessitando assim de um meio mais rico em nutrientes, o que justifica a ausência de crescimento no ágar água a 2% e o maior tempo de incubação para o crescimento. Os resultados obtidos permitem constatar que a utilização do meio de CMA é eficiente para a indução da zoosporogênese do *Pythium insidiosum*, mesmo que os períodos de incubação pré e durante indução sejam maiores aos períodos observados quando utilizado ágar água, como reportado nos estudos de MENDOZA & PRENDAS (1988). Além disso, por meio da metodologia da zoosporogênese, pode-se avaliar a morfologia de zoosporângios e zoósporos, constatando-se que todos os isolados estudados neste ensaio apresentaram características morfológicas condizentes com *Pythium insidiosum*, similares às descritas por SHIPTON et al. (1982), De COCK et al. (1987); CHAIPRASERT et al. (1990) e MENDOZA et al. (1996).

## CONCLUSÕES

O protocolo utilizado na indução da zoosporogênese mostrou-se eficiente e representa uma importante ferramenta, tanto para a identificação morfológica do *Pythium insidiosum*, como para a obtenção de zoósporos em quantidades suficientes para a inoculação em animais experimentais e desenvolvimento de testes de suscetibilidade.

## AGRADECIMENTOS E APRESENTAÇÃO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro durante a execução do trabalho e pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor.

Este trabalho é parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, vinculado ao Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## INFORME VERBAL

ALVES, S.H. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. E-mail: hartzsa@ccs.ufsm.br.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J. et al. Phylum Oomycota. In: \_\_\_\_\_. **Introductory mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. Chap.23, p.683-737.
- BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.5, p.715-718, 2005.
- BUERGELT, C. et al. Abdominal pythiosis in a bengal tiger. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, n.2, p.186-189, 2006.
- CAMUS, A.C. et al. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.567-571, 2004.
- CHAIPRASERT, A. et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**, v.33, n.6, p.317-323, 1990.
- 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, 1987.
- GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, p.695-720, 2003.
- IMWIDTHHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**, v.70, p.558-560, 1994.
- KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human Pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p.569-576, 2006.
- LEAL, A.T. et al. Pitiose – Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p.735-743, 2001.
- MEIRELES, M.C.A. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**, v.36, p.139-142, 1993.
- MENDOZA, L.; ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. **Mycopathologia**, v.94, p.123-129, 1986.
- MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v.104, p.59-62, 1988.

- 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.
- MENDOZA, L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Medicale**, v.6, n.4, p.151-164, 1996.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v.58, p.221-226, 1982.
- MILLER, R.I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v.81, p.23-28, 1983.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**, v.21, p.331-341, 1983.
- MOORE-LANDECKER, J. Zoosporic fungi. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentals of the fungi**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Chap.3, p.33-79.
- PEREZ, R.C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**, v.109, n.1-2, p.121-128, 2005.
- PRASERTWITAYAKIJ, N. et al. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.33, n.3, p.204-214, 2003.
- RAKICH, P.M. et al. Pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.262-269, 2005.
- RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Disease**, v.11, n.3, p.479-481, 2005.
- SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosum in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v.141, p.123-125, 1998.
- SANTURIO, J.M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosum developed and evaluated. **Vaccine**, v.21, p.2535-2540, 2003.
- SANTURIO, J.M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.1, p.1-14, 2006.
- SHIPTON, W.A. et al. Cell wall, zoospore and morphological characteristics of Australian isolates of a *Pythium* causing equine phycomycosis. **Transactions of the British Mycological Society**, v.79, n.1, p.15-23, 1982.
- SHIPTON, W.A. Zoospore induction and release in a *Pythium* causing equine phycomycosis. **Transactions of the British Mycological Society**, v.84, n.1, p.147-155, 1985.
- SHIPTON, W.A. Regulation by Ions of Zoospore release in *Pythium*. **Australian Journal of Botany**, v.35, n.1, p.79-89, 1987.
- TABOSA, I.M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Veterinary Pathology**, v.41, p.412-415, 2004.
- WELLEHAN, J.F. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.35, n.4, p.564-568, 2004.