

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Variações no perfil enzimático de isolados do  
oomiceto *Pythium insidiosum***

**RÉGIS ADRIEL ZANETTE**

**PORTO ALEGRE**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Variações no perfil enzimático de isolados do  
oomiceto *Pythium insidiosum***

Autor: **RÉGIS ADRIEL ZANETTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias.

Subárea: Microbiologia.

Especialidade: Micologia.

Orientador: **PROF. DR. LAERTE FERREIRO**

Coorientador: **PROF. DR. JANIO SANTURIO**

**PORTO ALEGRE**

**2010**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Domingos Guerra Zanette e Salete Zanette, pelos conselhos, ensinamentos, caráter moral e ético recebidos durante toda a minha formação. Ao meu irmão Magson, pelo companheirismo.

Ao professor Laerte Ferreira, por seus ensinamentos e paciência. Ao professor Janio Moraes Santurio, pelo seu profissionalismo, amor à profissão e dignidade, aliado a muito bom humor. Sou verdadeiramente grato à oportunidade recebida.

Ao professor Sydney Hartz Alves, pelos ensinamentos, amizade e atenção recebidos, e por sua dedicação à profissão.

À minha namorada Paula Bitencourt, pelo amor, carinho, compreensão e respeito. É muito bom poder contar contigo.

Aos amigos Adriano, Aleksandro, Felipe e Thiago pela amizade e convivência desde os tempos de graduação.

Aos mais do que colegas, amigos, do LAPEMI, pelo companheirismo, apoio e paciência durante esses anos juntos. Foi um período de grande aprendizado.

À UFRGS e à UFSM, pelo ensino público e de qualidade.

Ao CNPq, pela disponibilidade da bolsa de pesquisa.

*Ensinos vêm e vão. Essas amizades, guardarei para sempre.*

“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.”  
-*Sócrates*-

## RESUMO

*Pythium insidiosum*, classificado no Reino Stramenipila e Classe Oomycetes, é o agente etiológico da pitiose, uma doença diagnosticada principalmente em equinos, caninos e humanos. A secreção de enzimas por micro-organismos é considerada um fator importante na invasão tecidual. O presente estudo teve como objetivo analisar a atividade enzimática de isolados de *P. insidiosum* obtidos de lesões equinas (n=13), coelhos infectados experimentalmente (n=2) e uma amostra padrão (ATCC). Para isso, utilizou-se o kit comercial API ZYM. Zoósporos foram cultivados em caldo RPMI 1640 por 24h a 37 °C. Após esse período, a presença de hifas foi observada, as quais foram separadas e 65µl do líquido restante foram inoculados em cada um dos 20 poços (um controle e 19 com substratos específicos para cada enzima) do kit. As galerias foram então incubadas por 4 h a 37 °C. Os resultados foram obtidos através da leitura visual das reações. As análises foram feitas em triplicata e submetidas à análise de variância utilizando um nível de significância de 5%. Houve uma variação intraespecífica na atividade enzimática entre os isolados, sendo que enzimas dos grupos fosfohidrolases e éster hidrolases foram as mais prevalentes. Esses dados demonstram a capacidade de *P. insidiosum* em secretar enzimas que degradam substratos presentes em animais e em plantas, bem como a variabilidade enzimática entre os isolados.

**Palavras-chave:** *Pythium insidiosum*, atividade enzimática, API ZYM.

## **ABSTRACT**

*Pythium insidiosum* is classified in the kingdom Stramenipila, class Oomycetes. It causes pythiosis, a disease mainly diagnosed in horses, dogs, and humans. This study aimed at analyzing the enzymatic activity of *P. insidiosum* isolates obtained from equine lesions (n=13), experimentally infected rabbits (n=2) and a standard strain (ATCC 58637). To address this issue, the API ZYM commercial kit was used. Zoospores were cultivated in RPMI 1640 broth for 24 h at 37°C. After this period, the presence of hyphae was observed and they were carefully separated from the liquid phase. Then, 65 µl of this liquid were inoculated in each of the 20 microwells (one control, 19 containing specific substrates for each enzyme) of the API ZYM kit. The strips were incubated for 4h at 37°C. Results were obtained by visual observation of the reactions. The tests were carried out in triplicate and submitted to an analysis of variance using a significance level of 5%. An intraspecific variation among the enzymatic activities was observed among the isolates, where the group of phosphohydrolases and ester hydrolases were conspicuous among most of the isolates. Data here obtained highlighted the capacity of *P. insidiosum* in secreting enzymes capable of degrading substrates present in animals and plants, besides the enzymatic variability among the isolates.

**Keywords:** *Pythium insidiosum*, enzymatic activity, API ZYM.

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** – Galerias do kit API-ZYM inoculadas com os isolados LAPEMI 148, LAPEMI 138 e LAPEMI C28, de cima para baixo, respectivamente .....39

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Perfil enzimático do oomiceto <i>Pythium insidiosum</i> .....	37
---	----



## **LISTA DE QUADROS**

<b>QUADRO 1</b> - Quadro de leitura do kit API ZYM .....	23
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Pythium insidiosum</i> e pitiose.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Zoosporogênese .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>API ZYM - Sistema de detecção de atividade enzimática .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Pythium insidiosum* é um organismo aquático cosmopolita classificado no Reino Stramenipila, Classe Oomycetes (DE COCK *et al.*, 1987; WEBSTER & WEBER, 2007). É o agente etiológico da pitiose em mamíferos, o qual está intimamente relacionado ao contato de animais e humanos com águas contaminadas onde o agente produz sua forma infectante, que são zoósporos móveis (SANTURIO *et al.*, 2006a).

A pitiose é mais frequentemente diagnosticada em equinos, provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo; em caninos com apresentação gastrointestinal e cutânea; e em humanos nas formas subcutânea, vascular e ocular (SANTURIO *et al.*, 2003b). Acomete ainda bovinos (MILLER *et al.*, 1985; SANTURIO *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2005), felinos (BISSONETE *et al.*, 1991; RAKISH *et al.*, 2005), ovinos (TABOSA *et al.*, 2004; SANTURIO *et al.*, 2008) e, recentemente, foi descrito em um camelo (WELLEHAN *et al.*, 2004), um jaguar da América Central (CAMUS *et al.*, 2004) e um tigre (BUERGELT *et al.*, 2006).

O tratamento da pitiose em animais e humanos é complicado pelas características do agente, sobretudo sua composição de parede celular (LEAL *et al.*, 2001b). A maioria dos fármacos disponíveis atua primariamente inibindo a síntese do ergosterol, o qual não é o principal esteroide na membrana do *P. insidiosum* (DYKSTRA *et al.*, 1999), o que restringe o número de antimicrobianos que podem ser utilizados para o tratamento dessa enfermidade. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto *Pythium* spp. contêm celulose e  $\beta$ -glucanas (LEAL *et al.*, 2001b). Vários tratamentos têm sido utilizados, principalmente em equinos, incluindo tratamento químico, cirúrgico e imunoterápico, encontrando sucesso variável (SANTURIO *et al.*, 2003b).

Pouco se sabe sobre os fatores relacionados à infecção por *P. insidiosum*,

principalmente no que se refere às enzimas produzidas por este oomiceto e também àquelas enzimas que, comprovadamente, exercem função na patogenicidade do mesmo. Estudos iniciais enfatizavam a necessidade de uma lesão prévia na pele de equinos para o desenvolvimento da doença. Entretanto, Santurio *et al.* (1998) sugeriram a possibilidade de penetração dos zoósporos através dos folículos pilosos, baseados na detecção de hifas no interior do folículo de bovinos infectados naturalmente e no fato do quimiotaxismo ser mais ativo na região do pelo encontrada dentro do folículo piloso. Essa hipótese vem prescindir a necessidade de lesão na pele para que ocorra a germinação dos zoósporos.

Sabe-se que o crescimento e invasão fúngicos são dependentes da força exercida no ápice da hifa, aliada à secreção de enzimas capazes de degradar o substrato em questão (MONEY, 2001). Ravishankar *et al.* (2001) demonstraram que *P. insidiosum* não exerce força mecânica suficiente para penetrar a pele íntegra, entretanto há uma redução de 100 vezes nessa resistência quando ocorre a secreção de proteinase. Esta conclusão foi baseada através da comparação das pressões exercidas por uma hifa em particular com a resistência da pele humana e equina à penetração de uma agulha.

Shipton (1987) utilizando o kit comercial API ZYM (API System, La Balme-lesGrottes, France) analisou o perfil enzimático de 14 espécies de *Pythium* isoladas a partir de equinos e de quatro espécies isoladas de plantas. O inóculo utilizado era composto de proteínas obtidas a partir de hifas sonicadas, sendo este incubado a 35 °C por 12 h. O estudo serviu como base fenotípica para separar e classificar as espécies de *Pythium* isoladas de equinos, justificando a criação do nome *P. destruens*, que atualmente é sinônimo de *P. insidiosum* (MENDOZA & MARIN, 1989).

A utilização do kit semi-quantitativo API ZYM (Bio Mérieux, France) permite um estudo sistemático e rápido de 19 diferentes atividades enzimáticas. Diversos

autores têm utilizado esse método para estudar o perfil enzimático de diferentes espécies de fungos (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 1997; SÁENZ-DE-SANTAMARÍA *et al.*, 2006; FERNANADO *et al.*, 1999). Dentro dessa temática, os objetivos do presente estudo foram:

- Verificar a atividade enzimática de 14 isolados brasileiros e uma amostra padrão (ATCC 58637) de *P. insidiosum* através do método semiquantitativo API-ZYM, sendo elas: fosfatase alcalina, esterase, esterase lipase, lipase, leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -manosidase,  $\alpha$ -fucosidase;
- Avaliar se há diferença na atividade enzimática entre os isolados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Pythium insidiosum* e pitiose

*P. insidiosum*, agente etiológico da pitiose em mamíferos (PEREIRA *et al.*, 2007), pertence ao Reino Stramenipila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *P. insidiosum* (DE COCK *et al.*, 1987; WEBSTER & WEBER, 2007). Esta classificação foi fundamentada em estudos detalhados sobre a classificação dos fungos, baseados em sistemática filogenética e análises moleculares, entre outros, que dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: Fungi, Stramenopila e Protista (ALEXOPOULUS *et al.*, 1996). No entanto, Schurko *et al.* (2003) compararam espécies de *Pythium insidiosum* originárias das Américas, Ásia e Austrália, através de técnica molecular, evidenciando diferenças entre os isolados de *P. insidiosum* das três regiões estudadas, o que possibilita uma reclassificação como sub-espécies ou, talvez, novas espécies. Hoje, o Reino Straminopila recebe a denominação de Straminipila (WEBSTER & WEBER, 2007). *P. insidiosum* é a única espécie dentro desse reino, que inclui algas marrons e diatomáceas, capaz de originar doença em animais.

O gênero *Pythium* caracteriza-se por: produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada; reprodução sexuada oogâmica; parede celular composta de  $\beta$ -glucanas, celulose e hidroxiprolina; talo diploide; mitocôndria com crista tubular; características moleculares e bioquímicas peculiares, como uma rota alternativa para síntese do aminoácido lisina (MOORE-LANDECKER, 1996). Os oomicetos também diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, nos primeiros ele não é o principal esteroide (SANTURIO *et al.*, 2006a). De acordo com Hendrix (1970), espécies do gênero *Pythium* incorporam esteroides a partir do meio ao invés de produzi-los. Os esteroides são importantes para produção de estruturas sexuais *in vitro*, mas não são necessários para o crescimento da hifa vegetativa (GROOTERS, 2003).

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa que acomete equinos, provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo; caninos e felinos com apresentação gastrintestinal e cutânea; bovinos com doença cutânea; e humanos apresentando quadro clínico de arterite, queratite e celulite periorbital (SANTURIO *et al.*, 2006a). Epidemiologicamente a pitiose está intimamente relacionada com o contato

dos animais e humanos com águas contaminadas pelo agente, onde o mesmo produz zoósporos móveis que se constituem na forma infectante de *P. insidiosum* (MENDOZA *et al.*, 1996). Em 1983, Miller propôs um ciclo biológico para esse organismo, que se baseia na colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo, formando os zoosporângios. Os zoósporos livres na água, movimentam-se até encontrar outra planta ou animal, onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo. Essas observações sustentaram a teoria de infecção, sugerindo que os cavalos em contato com águas contaminadas poderiam atrair os zoósporos, os quais germinariam a partir de uma pequena lesão cutânea (MENDOZA *et al.*, 1993).

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (MEIRELES *et al.*, 1993; SANTURIO *et al.*, 1998; GROOTERS, 2003), e tem sido relatada nas Américas, alguns países europeus, sudeste asiático, Oceania e África (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996; MENDOZA *et al.*, 1996; RIVIERRE *et al.*, 2005). As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema. Segundo Miller & Campbell (1982), para a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40 °C e o acúmulo de água em banhados e lagoas. A pitiose equina é uma doença que ocorre em todas as regiões do Brasil, principalmente no Pantanal, onde há relação direta com o período das chuvas (outubro-março) e acarreta prejuízos significativos, direta ou indiretamente (LEAL *et al.*, 2001a). Não há predisposição por sexo, idade ou raça e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e o homem (MENDOZA *et al.*, 1996). A doença é progressiva, levando o animal ao emagrecimento e morte na maioria dos casos.

No Brasil, a pitiose foi descrita em equinos, bovinos, ovinos, caninos e humanos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em equinos. Pitiose nos equinos caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos, com a presença de massas necróticas denominadas de “kunkers” (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES *et al.*, 1993; SANTURIO *et al.*, 2003a). A doença nos equinos é conhecida por outros nomes como hifomicose, zigomicose, dermatite granular, “bursattee”, “Florida leeches”, granuloma ficomicótico, “swamp cancer” (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996) e “ferida da moda” (LEAL *et al.*, 2001a). As lesões cutâneas são as mais frequentes e atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toraco-abdominal, provavelmente devido ao

maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos (MILLER & CAMPBELL, 1982; CHAFFIN *et al.*, 1995). Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando grandes massas teciduais (5 a 500 mm), com bordas irregulares, de aparência tumoral e com hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas semelhantes a corais, chamadas internacionalmente de “kunkers” (SANTURIO *et al.*, 2006a). Conforme estes autores, os “kunkers” variam de 2 a 10 mm de diâmetro, tem forma irregular, ramificada, com aspecto arenoso e penetram no tecido granular, dentro de *sinus* formados ao longo do seu trajeto. Os animais apresentam intenso prurido e normalmente mutilam a lesão na tentativa de aliviar o desconforto (LEAL, 1999).

A segunda forma mais frequente de infecção em equinos é a intestinal, caracterizando-se por massas teciduais localizadas na parede do intestino, levando a diminuição e obstrução do lúmen (SANTURIO *et al.*, 2003a). A maioria dos casos descritos relata apenas uma lesão em cada animal, porém podem existir lesões cutâneas multifocais (MENDOZA & ALFARO, 1986; CHAFFIN *et al.*, 1992). Além disso, pode ocorrer disseminação para órgãos internos a partir de infecções subcutâneas (REIS *et al.*, 2003), como nos casos descritos de lesões ósseas (MENDOZA *et al.*, 1988; ALFARO & MENDOZA, 1990; EATON, 1993). Estes estudos referem-se à equinos com lesões cutâneas crônicas, localizadas nos membros e com grande proliferação do tecido granulomatoso, onde as lesões ósseas ficaram limitadas aos ossos adjacentes às lesões cutâneas.

A espécie canina é a segunda mais atingida pela pitiose, também nas formas cutânea e gastrintestinal (SANTURIO *et al.*, 2006a). A forma gastrintestinal é a mais comum e manifesta-se com distúrbios digestivos como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia (às vezes sanguinolenta) e presença de massas nodulares, quando submetidos à palpação abdominal (FISCHER *et al.*, 1994; DYKSTRA *et al.*, 1999; GROOTERS, 2003). Os cães afetados são normalmente oriundos de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados como açudes e banhados (FOIL *et al.*, 1984; FISCHER *et al.*, 1994; DYKSTRA *et al.*, 1999). As lesões cutâneas apresentam-se como dermatites piogranulomatosas ulcerativas, contendo áreas de necrose infiltradas por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos (ENGLISH & FROST, 1984; FOIL *et al.*, 1984; DYKSTRA *et al.*, 1999).

Pitiose em felinos é rara, havendo poucos relatos na literatura. Um deles refere-se a uma infecção nasal e retrobulbar, sem envolvimento de órgãos internos, cujo



diagnóstico baseou-se em imunohistoquímica, sorologia através de imunodifusão e isolamento do agente (BISSONNETTE *et al.*, 1991). No outro relato, foram dois casos de pitiose gastrointestinal em gatos nos Estados Unidos da América (RAKICH *et al.*, 2005). Recentemente, foram descritos os primeiros casos de pitiose em mamíferos não domésticos: pitiose cutânea e gastrointestinal em ursos (GROOTERS, 2003), pitiose pulmonar em um jaguar da América Central (CAMUS *et al.*, 2004) e um tigre com lesão intestinal (BUERGELT *et al.*, 2006).

A pitiose bovina também é pouco frequente, onde nos poucos relatos os autores descreveram lesões cutâneas, geralmente nos membros e caracterizadas por ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada. O primeiro caso foi reportado na região de Louisiana, EUA (MILLER *et al.*, 1985) e o segundo na região do Pantanal, Brasil (SANTURIO *et al.*, 1998). Recentemente, dois casos foram descritos: na Venezuela por Pérez *et al.* (2005) e um surto no sul do Brasil por Gabriel *et al.* (2008). Os casos observados no Brasil apresentaram cura espontânea das lesões. Já em ovinos essa doença é rara, tendo seu primeiro surto descrito no Brasil (TABOSA *et al.*, 2004), onde os animais afetados apresentaram feridas com lesões ulcerativas nas patas e também nas regiões pré-escapular e abdominal. O segundo relato de pitiose em ovinos também foi reportado no Brasil, e foi o primeiro caso de rinite granulomatosa por *P. insidiosum* descrito nesta espécie (SANTURIO *et al.*, 2008). A enfermidade ocorreu em quatro ovinos da raça Santa Inês e foi caracterizada por nodulações e necrose nasal, dificuldade respiratória e epistaxe intermitente (SANTURIO *et al.*, 2008).

Pitiose humana foi documentada pela primeira vez em 1985 (DE COCK *et al.*, 1987). Desde então, muitos casos têm sido relatados, com altas taxas de morbidade e mortalidade (PUPAIBOOL *et al.*, 2006). É comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, e dois fatores contribuem para a importância da pitiose nesse país: a prevalência de  $\beta$ -talassemia e presença de grandes áreas alagadas usadas para agricultura (TRISCOTT *et al.*, 1993). As infecções por *P. insidiosum* em humanos podem apresentar-se de três formas: lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos; forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos; e queratite, podendo ou não estar associada à talassemia (IMWIDTHAYA, 1994). No Brasil a pitiose teve seu primeiro relato em humanos no ano de 2005, na forma cutânea (BOSCO *et al.*, 2005).

Apesar de ser uma doença infectando predominantemente mamíferos, Pesavento

*et al.* (2008) descreveram um caso de pitiose em caraúna (*Plegadis chihi*), uma ave migratória ciconiiforme da família dos tresquiornitídeos. A ave apresentava úlceras epidérmicas na região das asas, pescoço, cabeça e membros pélvicos, sendo os padrões microscópicos tanto do oomiceto quanto da lesão semelhantes aos encontrados em mamíferos infectados.

O diagnóstico da pitiose, tradicionalmente, é feito pelos aspectos clínicos, histopatológicos e pelo isolamento e identificação do agente através de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas. O exame histopatológico é auxiliar no diagnóstico e necessita de outras provas para confirmação (SANTURIO *et al.*, 2006b). A identificação precoce da doença, no entanto, torna-se difícil através desses métodos (SANTURIO *et al.*, 2006a). Atualmente, métodos como imunohistoquímica e técnicas sorológicas auxiliam e suportam um diagnóstico precoce e correto (MENDOZA *et al.*, 1996). O sucesso no isolamento de *P. insidiosum* é alto quando amostras de biópsias são armazenadas ou transportadas à temperatura ambiente, com o acréscimo de antibióticos, entre um e três dias antes de seu processamento no laboratório (SANTURIO *et al.*, 2006a). O diagnóstico imunológico, pela técnica de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), possibilita a detecção de infecções precoces ou ainda subclínicas (MENDOZA *et al.*, 1997). Além de constituir-se numa poderosa ferramenta para o diagnóstico específico, também pode ser útil no monitoramento da resposta à terapia (GROOTERS, 2003). Testes de ELISA para detecção de pitiose em equinos, caninos, felinos, humanos e bovinos já foram desenvolvidos para diagnóstico precoce (GROOTERS *et al.*, 2002; PÉREZ *et al.*, 2005; SANTURIO *et al.*, 2006b). Existem ainda as técnicas moleculares constituindo importante ferramenta para o diagnóstico e identificação de *P. insidiosum*, principalmente através de PCR (reação em cadeia da polimerase) (JAEGER *et al.*, 2002; GROOTERS & GEE, 2002; REIS *et al.*, 2003; RIVIERRE *et al.*, 2005; BOSCO *et al.*, 2005; MENDONZA & NEWTON, 2005).

O tratamento da pitiose é influenciado principalmente pelo tamanho e evolução clínica da lesão, idade e estado nutricional do animal (MONTEIRO, 1999), tornando variável o sucesso das diferentes formas de tratamento. De acordo com Miller (1981) e Rochette *et al.* (2003), o tradicional tratamento da pitiose equina é cirúrgico, sendo o procedimento mais utilizado. Contudo, a intervenção cirúrgica é complicada devido às estruturas anatômicas envolvidas, pois a partir da permanência de fragmentos do agente podem ocorrer recidivas (MILLER, 1981; CHAFFIN *et al.*, 1995). O tratamento

cirúrgico apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais, onde seja possível a retirada de toda área afetada (SANTURIO *et al.*, 2006a).

No tratamento da pitiose equina os fármacos mais utilizados até o momento foram a anfotericina B e os compostos iodínicos, como iodeto de potássio e sódio (McMULLAN *et al.*, 1977; GONZALES *et al.*, 1979; MEIRELES *et al.*, 1993). McMullan *et al.* (1977) obtiveram 50% de eficiência associando remoção cirúrgica e anfotericina B; 30% apenas com anfotericina B e 20% não responderam aos tratamentos. Segundo Gonzales *et al.* (1979), os animais respondem ao iodeto de potássio associado à cirurgia ou isolado, porém o iodeto de potássio é mais eficiente quando usado após a extirpação cirúrgica do granuloma. Little & Kabay (1984) e Chaffin *et al.* (1992) também relataram o sucesso do tratamento cirúrgico seguido de iodeto de sódio em potros com pitiose cutânea. Entretanto, Meireles *et al.* (1993) não obtiveram sucesso em dois equinos tratados com iodeto de potássio endovenoso, até mesmo quando associado à cirurgia. Utilizando outras tentativas de tratamento, Sedrish *et al.* (1997), obtiveram sucesso no uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio como terapia suplementar após a remoção cirúrgica de lesões de pitiose equina. Porém, alguns autores afirmam que a ressecção cirúrgica total do granuloma combinada com imunoterapia específica para *P. insidiosum* é o tratamento mais indicado para cura de pitiose clínica em equinos (HUBERT & GROOTERS, 2002).

O tratamento da pitiose através da imunoterapia foi inicialmente proposto por Miller (1981), que desenvolveu um imunobiológico a partir de culturas do próprio agente. Neste estudo o índice de eficiência foi de 53%; e 75% quando associado à cirurgia (MILLER & CAMPBELL, 1982). No decorrer das décadas de oitenta e noventa vários autores utilizaram a imunoterapia, principalmente em equinos, cujos índices de cura não foram maiores que 70% (MENDOZA *et al.*, 1992) e 83,3% (MONTEIRO, 1999). Thitithanyanont *et al.* (1998) descreveram a utilização com sucesso de um imunoterápico no tratamento de pitiose em um menino talassêmico. Dykdtra *et al.* (1999) relataram o fracasso de uma vacina autógena utilizada em um cão com pitiose cutânea. Recentemente, Mendoza *et al.* (2003) testaram uma nova formulação de vacina para *P. insidiosum* em equinos e caninos e obtiveram cura em, respectivamente, 72% e 33% dos animais. Em contraste aos resultados obtidos em equinos e bovinos, a imunoterapia em felinos e caninos tem sido desapontadora (MENDOZA & NEWTON, 2005).

Até o presente momento, nenhuma das terapias antifúngicas propostas para a

pitiose canina apresentaram resultados satisfatórios. Entre os antifúngicos testados destacam-se a anfotericina, fluconazol, cetoconazol e itraconazol (FOIL *et al.*, 1984; ENGLISH & FROST, 1984; DYKSTRA *et al.*, 1999; JAEGER *et al.*, 2002; RIVIERRE *et al.*, 2005). Segundo alguns autores, a cirurgia continua como opção mais segura para o tratamento da pitiose canina (HNILICA, 1998, THOMAS & LEWIS, 1998; GROOTERS, 2003), embora as recidivas pós-operatórias sejam frequentes (GROOTERS, 2003). Por esta razão, Grooters (2003) indica a terapia com itraconazol (10 mg/Kg/ 24 h) associado a terbinafina (5-10 mg/Kg/ 24 h) por dois a três meses após cirurgia. Este mesmo autor relata que aproximadamente 15% dos cães com pitiose gastrointestinal responderam ao tratamento com itraconazol ou anfotericina B lipídica. Entretanto, Dykstra *et al.* (1999) utilizaram itraconazol (5 mg/kg/60 dias) em um cão não obtendo melhora. Grooters (2003) também observou melhora ou cura clínica e sorológica em alguns casos de pitiose cutânea canina e felina, quando administrou terbinafina associada ao itraconazol aos animais. E afirma que, embora o número de animais que responderam a este protocolo de tratamento tenha sido baixo, a combinação antifúngica pareceu superior à terapia isolada.

O tratamento da pitiose felina também apresenta resultados variados. Bissonnette *et al.* (1991) ao realizarem o tratamento de um felino com pitiose nasal e retrobulbar com cetoconazol, observaram que houve melhora clínica, porém a doença recidivou após o término do tratamento. Já Rakich *et al.* (2005) encontraram resultados diferentes ao tratar dois felinos com pitiose gastrointestinal. O animal tratado com a associação terbinafina/itraconazol, durante dois meses depois da retirada cirúrgica da lesão, apresentou cura clínica sem recidivas. Porém, morreu subitamente quatro meses após a cirurgia. O outro felino, que recebeu terapia com itraconazol, também por dois meses depois da retirada cirúrgica da lesão, demonstrou sorologia negativa, detectada por meio de um teste de ELISA, realizado cinco meses após tratamento. Este animal permaneceu em observação por nove meses, não apresentando recidiva da lesão durante esse período.

De forma similar aos resultados clínicos, os testes de suscetibilidade *in vitro* com agentes antifúngicos, realizados com *P. insidiosum*, também têm demonstrado resultados contraditórios. Em um estudo de Sekhon *et al.* (1992) os poliênicos anfotericina B, hamicina e seus análogos não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azólicos fluconazol, cetoconazol e miconazol inibiram os isolados de *P. insidiosum* testados *in vitro*, com o miconazol apresentando os melhores resultados,

seguido do cetoconazol. Entretanto, Triscott *et al.* (1993), relatando pitiose subcutânea na região periorbital de dois jovens, constataram a boa resposta ao tratamento com anfotericina B, contrariando os resultados obtidos nos testes de sensibilidade. Em outro estudo, os antimicóticos anfotericina B, flucitosina, miconazol e griseofulvina não inibiram o crescimento deste oomiceto, enquanto o itraconazol apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o isolado de *P. insidiosum* testado (SHENEP *et al.*, 1998). De acordo com Shenep *et al.* (1998), a associação de terbinafina e itraconazol apresentou efeito sinérgico e foi utilizada, com sucesso, no tratamento de um menino com infecção facial.

Uma nova proposta terapêutica que vem sendo investigada é a utilização de fármacos que bloqueiam a síntese de  $\beta(1,3)$ -D-glucanas, através da inibição não competitiva da enzima  $\beta(1,3)$ -D-glucana sintetase. Resultados *in vitro* demonstraram que *P. insidiosum* é pouco susceptível à caspofungina (L-743, 872, MK-0991), um derivado semi-sintético da pneumocandina Bo, e testes *in vivo* demonstraram que esse agente apresenta somente ação fungistática (PEREIRA *et al.*, 2007). Aliado a isso, o alto custo do mesmo tem tornado seu uso limitado (PEREIRA *et al.*, 2008).

## 2.2 Zoosporogênese

A zoosporogênese *in vitro* é uma ferramenta fundamental, tanto para a identificação de *P. insidiosum*, como para a obtenção de zoósporos, em quantidades suficientes, para desenvolvimento de testes de suscetibilidade *in vitro* e para inoculação em animais experimentais (PEREIRA *et al.*, 2008). Para obtenção de inóculo para testes de suscetibilidade *in vitro* com *P. insidiosum* e para reprodução experimental da pitiose em coelhos estima-se que o número ideal de zoósporos seja em torno de 20.000 zoósporos/mL (SANTURIO *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2007).

A produção de zoósporos inicia com a formação de zoosporângios, os quais se desenvolvem a partir de hifas que colonizaram certos tipos de plantas (GROOTERS, 2003). A obtenção de zoosporângios *in vitro* é realizada através da indução da zoosporogênese em meio líquido (SHIPTON, 1985; CHAIPRASERT *et al.*, 1990). Neste contexto foram desenvolvidos protocolos para indução da zoosporogênese em laboratório (MENDOZA & PRENDAS, 1988), os quais vêm sendo aprimorados e adaptados (PEREIRA *et al.*, 2008).

O protocolo para indução da zoosporogênese, recentemente notificado, baseia-se

no parasitismo de fragmentos de grama (*Paspalum notatum*) por hifas de *P. insidiosum* em um meio pobre em nutrientes e, a seguir, na incubação dessas gramas parasitadas em Meio de Indução rico em sais, e com temperatura e pH adequados (PEREIRA *et al.*, 2008). Este protocolo mostra que os zoósporos podem ser produzidos a partir do cultivo de *P. insidiosum* em fragmentos de gramíneas sobre Corn Meal Agar (CMA), após cinco dias de incubação a temperatura de 37 °C. E, após esse período de cultivo, os fragmentos de grama parasitados por *P. insidiosum* são transferidos para uma placa de Petri contendo Meio de Indução, composto pela solução A [ $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2HPO_4$ ] e solução B [ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CaCl_2$ ]. O Meio de Indução é obtido pela mistura de 0,5 ml da solução A e 0,1 ml da solução B em 1000 ml de água destilada estéril. As placas de Petri contendo o Meio de Indução juntamente com os fragmentos vegetais infectados são incubadas a 37 °C por 24 horas (PEREIRA *et al.*, 2008). Os autores concluíram que após este período de indução, o número máximo de zoósporos obtidos ocorreu entre seis e oito horas de incubação, onde aproximadamente 87% dos isolados produziram mais de 20.000 zoósporos/ml.

### 2.3 API ZYM – Sistema de detecção de atividades enzimáticas

O sistema API ZYM<sup>®</sup> é um micrométodo semiquantitativo de detecção de atividades enzimáticas que se pode aplicar a diferentes tipos de amostras (micro-organismos, suspensões celulares, tecidos, líquidos biológicos, etc.). Permite estudar rápida e simultaneamente 19 atividades enzimáticas a partir de pequenas quantidades de amostra. Apresenta-se sob a forma de uma galeria de 20 micro-poços (cúpulas) cujo fundo é constituído por um suporte que contém o substrato enzimático com tampão. Este suporte destina-se a favorecer o contato entre a enzima e o substrato geralmente insolúvel.

Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa, que rehidrata os substratos. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de cor, reveladas pela adição de reagentes (Quadro 1).

**Quadro 1.** Quadro de leitura do kit API ZYM.

Nº	Enzima detectada	Substrato	pH	Reação	
				Positiva	Negativa
1	Testemunho			Incolor ou cor da amostra se esta tiver uma cor pronunciada	
2	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato	8,5	Violeta	Incolor
3	Esterase	2-naftil butirato	6,5	Violeta	
4	Esterase lipase	2-naftil caprilato	7,5	Violeta	
5	Lipase	2-naftil miristato	"	Violeta	
6	Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida	"	Laranja	
7	Valina arilamidase	L-valil-2-naftilamida	"	Laranja	
8	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida	"	Laranja	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8,5	Laranja	
10	$\alpha$ -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7,5	Laranja	
11	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato	5,4	Violeta	
12	Naftol-AS-BI-fosfodrolase	Naftol-AS-BI-fosfato	"	Azul	
13	$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-galactopiranosida	"	Violeta	
14	$\beta$ -galactosidase	2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosida	"	Violeta	
15	$\beta$ -glucuronidase	Naftol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronida	"	Azul	
16	$\alpha$ -glucosidase	2-naftil- $\alpha$ D-glucopiranosida	"	Violeta	
17	$\beta$ -glucosidase	6-Br-2-naftil- $\beta$ D-glucopiranosida	"	Violeta	
18	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- $\beta$ D-glucosaminida	"	Castanho	
19	$\alpha$ -manosidase	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-manopiranosida	"	Violeta	
20	$\alpha$ -fucosidase	2-naftil- $\alpha$ L-fucopiranosida	"	Violeta	

Cada cúpula deve ser inoculada com 65  $\mu$ l da solução previamente preparada, com uma concentração homogênea de inóculo. A incubação é feita por 4 h, com temperatura de acordo com a amostra em questão, devendo ser idêntica no âmbito de um determinado trabalho.

Após incubação, adiciona-se uma gota de reagente Zym A (2,5g de Trizma base, 1,1 ml de ácido clorídrico 37%, 1,0 g lauril sulfato de sódio e 10 ml de água destilada esterilizada) e Zym B (0,04 g de "Fast blue BB" e 10 ml de metoxietanol). Após deixar as colorações se estabilizarem (5 min), a leitura é registrada na ficha de resultados, sendo numa escala de 0 a 5 (0 correspondente a uma reação negativa e 5 a uma reação de intensidade máxima). A partir da intensidade da cor, os resultados são então convertidos em nanomoles (nmol) de substrato hidrolizado, conforme a seguir: 1 = 5 nmol, 2 = 10 nmol, 3 = 20 nmol, 4 = 30 nmol e 5 = >40 nmol.

Inicialmente, o kit API ZYM foi utilizado na identificação de enzimas bacterianas, sendo os padrões enzimáticos obtidos utilizados para taxonomia e tipificação dos micro-organismos (HUMBLE *et al.*, 1977). Esses autores relatam que o

método é de fácil uso, não requer reagentes além dos que são fornecidos pelo kit e o resultado da maioria dos organismos é de fácil interpretabilidade e repetibilidade. Embora não tenha sido desenvolvido para alcançar a precisão de procedimentos espectrofotométricos ou eletroforéticos, o kit API ZYM pode ser usado em métodos de “*screening*”, proporcionando assim um amplo espectro de determinações enzimáticas.

Essas vantagens levaram diversos autores a utilizar o ki API ZYM não só em bacteriologia, mas também em micologia. A viabilidade do seu uso foi comprovada na pesquisa enzimática de fungos filamentosos (SÁENZ-DE-SANTAMARÍA *et al.*, 2006; PAPINI & MANCIANTI, 1996), leveduras de interesse médico (CASAL & LINARES, 1983) e industrial (PENNACCHIA *et al.*, 2008), larvas (ANGULO-VALADEZ *et al.*, 2007), entre outros.

Os substratos presentes nos poços das galerias do kit API ZYM permitem verificar a atividade de diferentes grupos de enzimas, sendo elas: proteases, éster hidrolases, fosfohidrolases e glicosidases. Todos esses grupos exercem função tanto na invasão tecidual quanto na nutrição do organismo invasor. Um patógeno que invade tecidos de mamíferos deve ser capaz de crescer na temperatura corporal de seu hospedeiro, e, presumidamente, secretar enzimas para digerir proteínas ou lipídios, que servem como fonte primária de calorías (DAVIS *et al.*, 2006). No entanto, é importante presumir com cuidado o papel de uma enzima em particular quando o experimento restringe-se a um único aspecto do ciclo de vida do patógeno como um todo. Assim, seria impossível saber se o crescimento de um mutante deficiente em determinada enzima cessou porque este encontrou uma barreira física ou porque se esgotou sua fonte de nutrientes (RAVISHANKAR *et al.*, 2001). Por esta razão, a significância de enzimas degradadoras de tecidos no processo infeccioso permanece uma questão não esclarecida completamente.



### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

## ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Pythium* *insidiosum*

**Artigo submetido à revista *Veterinary Microbiology***

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Microbiology  
Manuscript Draft

Manuscript Number: VETMIC-D-09-3998

Title: Enzymatic activities of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates

Article Type: Research Paper

Keywords: pythiosis insidiosum, oomycete, exoenzymes, virulence

Corresponding Author: Mr. Régis Zanette,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Régis Zanette

Order of Authors: Régis Zanette; Laerte Ferreiro; Sydney Alves; Francielli Jesus; Claudia Lautert; Andréia Spanemberg; Janio Santurio

### **Enzymatic activities of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates**

Zanette, R.A.<sup>a</sup>, Ferreiro, L<sup>a</sup> Alves, S.H.<sup>b</sup>, Jesus, F.P.K.<sup>b</sup>, Lautert, C.<sup>a</sup>,  
Spanamberg, A.<sup>a</sup>, Santurio, J.M.<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Micologia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia,  
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

\*Corresponding author: [santurio@smail.ufsm.br](mailto:santurio@smail.ufsm.br)

Address: Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Postal Code 97105-900, Santa  
Maria, RS, Brazil. Tel/fax: +55-55-32208906

## Abstract

*Pythium insidiosum* is an oomycete fungus, classified in the Kingdom Stramenipila. As the secretion of hydrolases is considered an important factor in fungal virulence, we evaluated the extracellular enzymatic activity of 14 Brazilian *P. insidiosum* isolates and a standard strain (ATCC 58637) by the API-ZYM System screening method. Zoospores were grown in RPMI 1640 broth, and 65  $\mu$ L of the liquid phase was inoculated in each cupule of the API-ZYM strips. Although phosphohydrolases and ester hydrolases were conspicuous among all isolates, differences in the enzymatic activities were observed.  $\beta$ -glucosidase was also present in most of the isolates. The data obtained here highlight the abilities of this aquatic oomycete in colonising plant and animal tissues.

**Keywords:** pythiosis insidiosus, oomycete, exoenzymes, virulence.

## Introduction

Hyphal microorganisms (e.g., fungi and oomycete water moulds) colonise solid food materials by invasive growth. This colonisation process depends upon the exertion of force by the growing apices of the hyphae, coupled with the secretion of substrate-degrading enzymes. Lytic enzymes are also secreted by pathogenic fungi to invade plant and animal tissues (Money, 2001).

Among more than 200 fungal species that are pathogens of plants, *Pythium insidiosum* is the only one known to also be pathogenic for mammals, with the greatest number of outbreaks occurring in horses, dogs and humans (Santurio et al., 2003). This zoosporic fungus of the Phylum Oomycota, kingdom Stramenipila (De Cock et al., 1987), is the causative agent of pythiosis, a disease characterised in equines by cutaneous and subcutaneous lesions with the presence of eosinophilic granulomas with necrotic masses called “kunkers”.

In common with oomycete pathogens of plants, the prevailing model for infection in pythiosis suggests that the infectious propagule is an aquatic zoospore (Santurio et al., 2006; Mendoza et al., 1993). Hyphae emitted towards the host species colonise cutaneous and subcutaneous tissues, produce intestinal lesions, invade blood vessels and can proliferate within bone (Bentick-Smith et al., 1989).

Although the exertion of invasive pressure is crucial for tissue colonisation, hyphae of *Pythium* species are not sufficiently powerful to penetrate solid tissues without the concerted activity of secreted enzymes (MacDonald et al., 2002;

Ravishankar et al., 2001). In the recent literature, Davis et al. (2006) reported substantial secreted protease activity (serine proteases) in three different *P. insidiosum* strains. The experiments indicated that tissue-degrading enzymes must effect a significant reduction in tissue strength to allow hyphal penetration of plant or animal tissues. As further data on the enzymatic profile of this oomycete and its intraspecific variability with regard to enzyme activity are scarce, we investigated the production of 19 hydrolytic enzymes by Brazilian *P. insidiosum* strains isolated from animal pythiosis.

### Materials and methods

This study included twelve Brazilian *P. insidiosum* strains obtained from equine pythiosis, two strains (C20, C28) re-isolated from experimentally infected rabbits (Pereira et al., 2008) and a standard strain (ATCC 58637). The identities of the isolates were confirmed by a PCR-based assay (Rodrigues et al., 2006). Strains were initially cultivated in Corn Meal Agar at 37 °C and subsequently subjected to zoosporogenesis (Pereira et al. 2008). Zoospores were counted using a Neubauer chamber and 2.5 to 7.5 x 10<sup>3</sup> zoospores were transferred to 2 mL of RPMI 1640 broth containing L-glutamine (Sigma–Aldrich, Germany) and buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid. Tubes with inocula were maintained at 37 °C for 24 h.

Enzymatic activities were determined by means of the API-ZYM System (Bio Mérieux, Marcy- l’Etoile, France) in accordance with the manufacturer’s instructions. Briefly, 65 µl of the liquid phases from incubated cultures were added to each well of the API-ZYM tray and maintained at 37 °C for 4 h. Hyphae of *P. insidiosum* were carefully separated from the inoculum. The results were determined in nanomoles (nmol) of the hydrolysed substrate according to the intensity of the colour reaction on a scale of 1-5, i.e., 1 = 5 nmol, 2 = 10 nmol, 3 = 20 nmol, 4 = 30 nmol and 5 = >40 nmol. The tests were carried out in triplicate and submitted to an analysis of variance using a significance level of 5%. Enzymatic activities of all strains were compared to the control (RPMI broth only) using the Dunnet *post hoc* test. Differences among isolates were analysed by the Tukey *post hoc* test.

### Results

The most conspicuous enzymatic activities shown by the 15 *P. insidiosum* isolates were alkaline phosphatase (ALP), esterase, esterase lipase, acid phosphatase (ACP), naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and  $\beta$ -glucosidase (P <0.01). Lipase activity

was also observed ( $P < 0.05$ ). Eight isolates also produced low levels of trypsin, but the activity of this enzyme did not differ significantly from the control ( $P > 0.05$ ; Fig. 1). Within the isolates, differences in the production of  $\beta$ -glucosidase ( $P < 0.001$ ), esterase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase ( $P < 0.01$ ) and ACP ( $P < 0.05$ ) were observed (Fig. 2).

Our results demonstrate a high intraspecific variability in enzymatic activity. ALP, ACP, esterase, esterase lipase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase activities were detected in 100% of the *P. insidiosum* isolates. Lipase and  $\beta$ -glucosidase activities were detected in 86 and 80% of the isolates, respectively. No differences in the enzymatic activity were observed according to the culture age, animal species (equine or rabbit).

### Discussion

The API-ZYM system is a semiquantitative method that permits the rapid detection of 19 enzymes. Many studies (Sáenz-de-Santamaría et al., 2006; Schaller et al., 2005; Fernando et al., 1999; Brasch & Zaldua, 1994) have confirmed its usefulness in mycology. Although the composition of the growth medium can affect enzymatic activity (Brasch & Zaldua, 1994), RPMI broth has shown good results in susceptibility tests with this oomycete (Cavalheiro et al., 2009; Argenta et al., 2008; Pereira et al., 2007) and it is recommended for broth-dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi (CLSI, 2008). Besides the excellent growth of zoospores, the RPMI broth allowed the establishment of a standardised inoculum; we were also able to analyse the enzymes secreted at the moment that a germ tube is produced by the zoospore, as it occurs in infections (Hardham, 2007; Mendonza et al., 1993). Moreover, bacterial contamination is easily avoided by using this broth, a rather trivial point when an enzymatic profile is required.

The low proteolytic activity seen did not agree with the results reported by Davis et al. (2006) who, using SDS-substrate-PAGE, obtained serine proteases by cultivating *P. insidiosum* in 0.1% collagen as the principal source of carbon, nitrogen and sulphur. These differences could be explained by the methodology employed. Several authors have demonstrated the influence of carbon source, pH, medium composition and other parameters on enzyme expression (Sáenz-de-Santamaría et al., 2006; Brasch & Zaldua, 1994).

Conversely, Shipton (1987) in an effort to differentiate plant and animal isolates, found similar enzymatic profile from our study for the Australian equine derived *Pythium* spp., with the exception of the presence of alpha-glucosidase. However, instead of zoospores the author used sonicated proteins obtained from hyphal fragments grown on a glucose broth medium (35 °C, 12 h) for inoculating the API ZYM tray. These findings point to alpha-glucosidase as an intracellular enzyme, since only extracellular enzymes were researched in our study.

Differences in the enzymatic production observed among the isolates were expected. Biochemical variability or inconsistency among Brazilian *P. insidiosum* strains have been reported in susceptibility tests with the same isolates (Cavalheiro et al., 2009; Argenta et al., 2008). Phylogenetic analysis has demonstrated evolutionary distances among the isolates used in this experiment (data not published). However, a more extensive data base is required before a key based on phenotypic patterns can be constructed.

Any microorganism that attempts to colonise a plant must contend with the cell wall. One of the most conspicuous effects of microorganisms on plant cell walls is enzymatic degradation. The polymers present in the plant cell wall are insoluble, except for certain soluble enzymes and some polymers during incorporation and turnover. Most microbial cell-wall-degrading enzymes are extracellular, i.e., secreted. Enzymes such as  $\beta$ -xylosidase and  $\beta$ -glucosidase, which degrade the soluble products of extracellular enzymes, can be either extracellular or intracellular (Walton, 1994). The inability of *P. insidiosum* to degrade plant polysaccharides reported by Davis et al. (2006) was not confirmed in our study, since extensive  $\beta$ -glucosidase activity was seen.

Cellulases (i.e.,  $\beta$ -glucosidase in our study) might not be particularly important in pathogenesis, since extensive cellulose degradation typically occurs only late in infection (Cooper, 1984). However, in *P. insidiosum* this enzyme might have a more fundamental function. The shape and growth pattern of a fungal or oomycete hypha depends upon the physical properties of its surrounding cell wall (Gooday, 1995). The first morphological sign of zoospore germination is the accumulation of apical vesicles beneath the site of germ tube emergence. As well as contributing to the expanding plasma membrane, the vesicles contain substrates and enzymes required for cell wall formation, and molecules that protect the germ tube and attach it to the underlying surface (Hardham, 2007). Since this oomycete cell wall contains large amounts of  $\beta$ (1-3)D-glucan (Pereira et al., 2008; Moore-Landecker, 1996), the enzymatic action of  $\beta$ -

glucosidase would be fundamental in wall-loosening and growth due to the hydrolysis of  $\beta(1-3)$ D-glucan linkages (Fry, 1995).

On the other hand, the production of active oxygen species (AOS) in an oxidative burst, such as superoxide anions ( $O_2^-$ ), hydroxy radicals ( $\cdot OH$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), has been observed in many plant–pathogen interactions and plays an important role in plant defence (Honée, 1999). Toxic oxygen metabolites are also generated by activated phagocytic cells and are known to be important in the killing of microbes (Mansour et al., 2002; Remaley et al., 1984). Remaley et al. (1984) reported that the presence of ACP on the cell surface of *Leishmania donovani* promastigotes impaired the ability of phagocytic cells to kill the parasite. *P. insidiosum* ACP might be implicated in reducing superoxide production, a virulence factor implied in intracellular survival.

Both ALP and ACP have been considered to be enzymes with no specific cell localisation. Studies on extracellular ALP in *Bacillus* spp. revealed the relationship between the biosynthesis of this enzyme and carbohydrate metabolism (Shapirova et al. 2000). Furthermore, a highly significant positive correlation was also established between the adhesion of *Candida* to mammalian buccal epithelial cells and ALP and ACP activity. These relationships, described for the first time by Fernanado et al. (1999), imply that the phosphatases of *Candida* species may play a crucial role in potentiating their virulence.

Esterases and lipases are characterised by their ability to catalyse the hydrolysis of ester bonds of mono-, di- and triacylglycerols as well as phospholipids. The fatty acids of the skin, secreted by sebaceous glands, can be regarded as the main local defence mechanism, and certain branched-chain fatty acids have fungistatic and bactericidal properties. The broad lipolytic activity of *C. albicans* is reported to be an important factor for the persistence and virulence of this yeast in human tissue (Schaller et al., 2005). The ability of the *P. insidiosum* zoospores to initiate an infection is due to the production of a substance that allows them to maintain tight contact with the host (Mendoza et al., 1993). Our results suggest that the expressive production of these fatty acid-modifying enzymes (FAME) by *P. insidiosum* aid encystment due to the reduction in surface hydrophobicity.

Shipton (1987) observed lipase activity in all (n=14) Australian equine-derived *Pythium* spp. (one showed weak activity), although only one out of four plant isolates showed activity of this enzyme. Additional tests showed that only equine-derived

*Pythium* isolates had activity on 2-naphthyl laurate (C12 saturated) and 2-naphthyl oleate (C18 unsaturated). Furthermore, we observed lipase activity in 86% of the *P. insidiosum* isolates. This FAME seems to play a crucial role in *P. insidiosum* pathogenicity. We hypothesise that a different incubation temperature (e.g., 25 °C) would provide new enzymatic profiles. Ravishankar et al. (2001) reported that the force exerted by hyphae of three *P. insidiosum* strains extending from cornmeal agar into distilled water significantly increased with the elevation of experimental temperature from 24 to 37 °C. Moreover, studies involving environmental strains (Supabandhu et al., 2007) might enhance the knowledge of the pathogenic role of enzymes secreted by *P. insidiosum*.

In conclusion, *P. insidiosum* zoospores grown in RPMI 1640 broth produce extracellular enzymes that diverge among the isolates. Although far from reflecting conditions in nature, further enzymatic studies on *P. insidiosum* isolates and non-mammalian pathogenic *Pythium* species along with the use of different incubation temperatures would enhance the role of each enzyme in the pathogenic process. The detection of enzymes that are not possible to evaluate using the API-ZYM strip (i.e., phospholipases, xylanases and cutinases) might therefore clarify the capacity of *P. insidiosum* to penetrate intact plant and animal tissues.

### Acknowledgements

This study was supported by CNPq (the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil) and by the Laboratório de Pesquisas Micológicas of Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

### References

- Argenta, J.S., Santurio, J.M., Alves, S.H., Pereira, D.I.B., Cavalheiro, A.S., Spanemberg, A., Ferreiro, L., 2008. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 767-769.
- Bentick-Smith, J., Padhye, A.A., Maslin, W.R., Hamilton, C., McDonald, R.K., Woody, B.J., 1989. Canine pythiosis— isolation and identification of *Pythium insidiosum*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1, 295–298.
- Brasch, J., Zaldua, M., 1994. Enzyme patterns of dermatophytes. *Mycoses.* 37, 11-16.
- Cavalheiro, A.S., Zanette, R.A., Spader, T.B., Lovato, L., Azevedo, M.I., Botton, S., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2009. *In vitro* activity of terbinafine associated to



amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. Vet. Microbiol. 137, 408-411.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, second edition. CLSI document M38-A2 (ISBN 1-56238-668-9). Clin. Lab. Stand. Inst. Wayne, Pennsylvania, USA.

Cooper, R. M., 1984. The role of cell wall-degrading enzymes in infection and damage. In Wood, R.K.S., Jellis, G.J. (Eds.), Plant Diseases: Infection, Damage, and Loss, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 13-27.

Davis, D.J., Lanter, K., Makselan, S., Bonati, C., Asbrock, P., Ravishankar, J.P., Money, N.P., 2006. Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. Myc. Res. 110, 96-103.

De Cock, A.W.A.M., Mendoza, L., Padhye, A.A., Ajello, L., Kaufman, L., 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. J. Clin. Microbiol. 25, 344-349.

Fernanado, P.H., Panagoda, G.J., Samaranayake, L.P., 1999. The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. APMIS 107, 1034-1042.

Fry, S.C., 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46, 497-520.

Gooday, G.W., 1995. Cell walls. In Gow, N.A.R., Gadd, G.M. (Eds.), The growing fungus, Chapman & Hall, London, England, pp. 41-62.

Hardham A.R., 2007. Cell biology of fungal and oomycete infection of plants. In Howard, R.J., Gow, N.A.R. (Eds.), The Mycota VIII. Biology of the Fungal Cell. Berlin, Deutschland, Springer-Verlag, pp. 251-289

Honée, G., 1999. Engineered resistance against fungal plant pathogens. Eur. J. Plant Pathol. 105, 319-326.

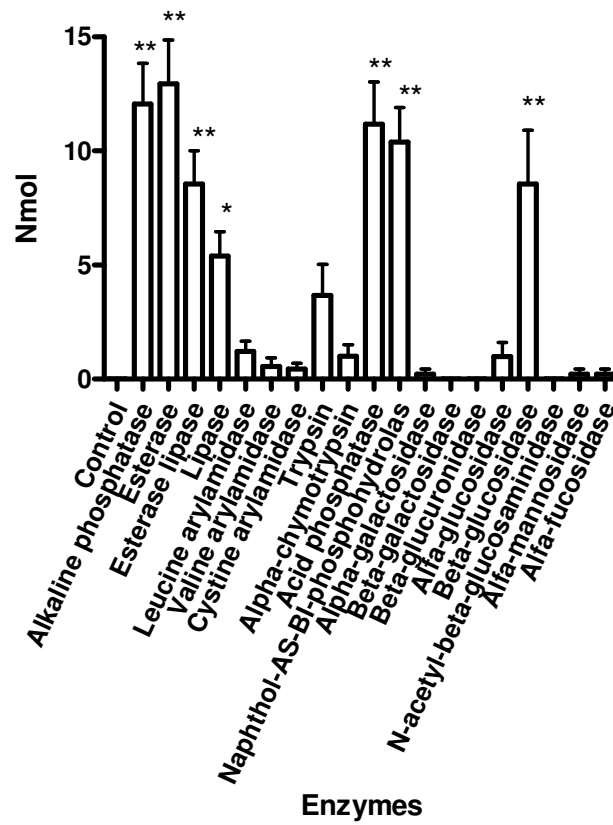
MacDonald, E., Millward, L., Ravishankar, J.P., Money, N.P., 2002. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. Fungal Genet. Biol. 37, 245-249.

Mansour, M.K., Levitz, S.M., 2002. Interactions of fungi with phagocytes. Curr. Opin. Microbiol. 5, 359-365.

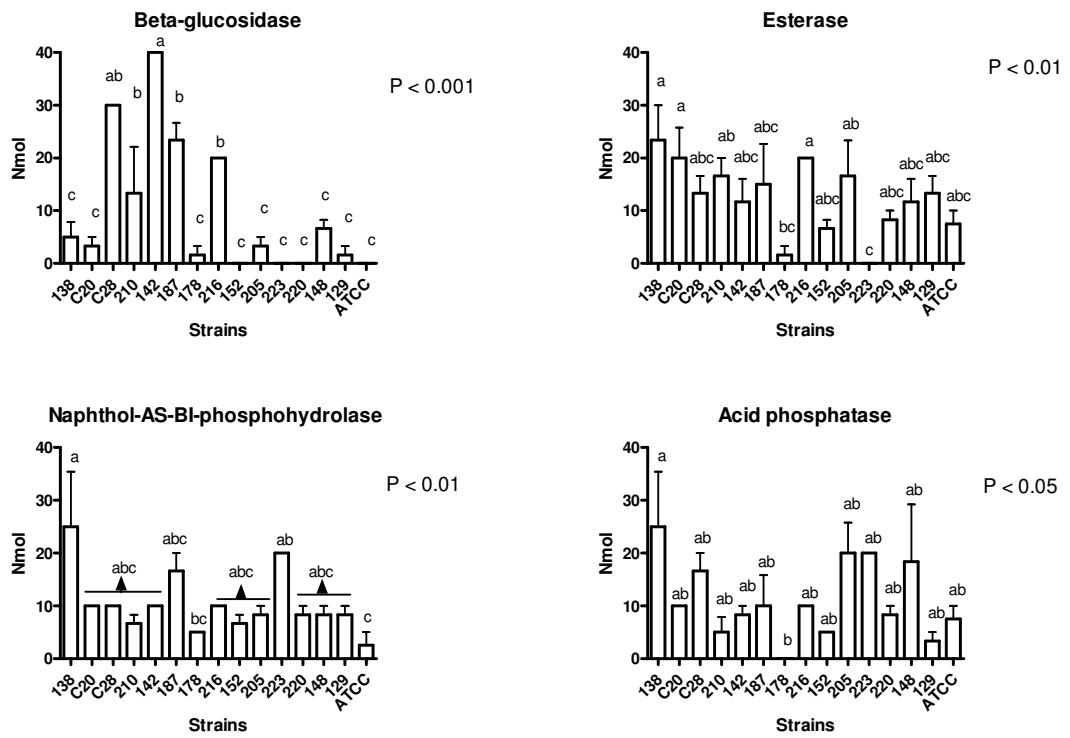
Mendoza, L., Hernandez, F., Ajello, L., 1993. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. J. Clin. Microbiol. 2967-2973.

Moore-Landecker, E., 1996. Zoosporic fungi. Prentice Hall, New Jersey, pp. 33-79.

- Money, N. P., 2001. Biomechanics of invasive hyphal growth. In Howard, R.J., Gow, N.A.R. (Eds.), *The Mycota VIII. Biology of the Fungal Cell*, Springer-Verlag, Berlin, Deutschland: pp. 237-249.
- Pereira, D.I.B., Santurio, J.M., Alves, S.H., Argenta, J.S., Pötter, L., Spanamberg, A., Ferreira, L., 2007. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1168-1171.
- Pereira, D.I.B., Santurio, J.M., Alves, S.H., Azevedo, M.I., Silveira, F., Costa, F.F., Sallis, E.S.V., Pötter, L., Ferreira, L., 2008. Comparison between immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. *J. Mycol. Méd.* 18, 129-133.
- Ravishankar, J.P., Davis, C.M., Davis, D.J., MacDonald, E., Makselan, S.D., Millward, L., Money, N.P., 2001. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. *Fungal Genet. Biol.* 34, 167-175.
- Remaley, A.T., Kuhns, D.B., Basford, R.E., Glew, R.H., Kaplan, S.S., 1984. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O<sub>2</sub><sup>-</sup> production. *J. Biol. Chem.* 259, 11173-11175.
- Rodrigues, A., Graça, D.L., Fontoura, C., Cavalheiro, A.S., Henzel, A., Schwendler, S. E., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2006. Intestinal dog pythiosis in Brazil. *J. Mycol. Méd.* 16, 37-41.
- Sáenz-de-Santamaría, M., Guisantes, J.A., Martínez, J., 2006. Enzymatic activities of *Alternaria alternata* allergenic extracts and its major allergen (Alt a 1). *Mycoses* 49, 288-292.
- Santurio, J.M., Leal, A.T., Leal, A.B.M., Festugatto, R., Lubeck, I., Sallis, E.S.V., Copetti, M.V., Alves, S.H., Ferreira, L., 2003. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosi developed and evaluated. *Vaccine* 21, 2535-2540.
- Santurio, J.M., Alves, S.H., Pereira, D.I.B., Argenta, J.S., 2006. Pythiosis: an emergent mycosis. *Acta Scientiae Veterinariae* 34, 1-14.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., Hube, B., 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48, 365-377.
- Shapirova, M.R., Balaban, N.P., Leshchinskaia, I.B., 2000. Localization of alkaline phosphatase in *Bacillus intermedius* cells. *Mikrobiologiya* 69, 197-202.
- Shipton, W.A., 1987. *Pythium destruens* sp. nov., an agent of equine pythiosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 25, 137-151.
- Supabandhu, J., Fisher, M.C., Mendoza, L., Vanittanakom, N., 2007. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. *Med. Mycol.* 46, 41-52.
- Walton, J., 1994. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104, 1113-1118.



**Figure 1.** Means values for the enzymatic activity of 15 *Pythium insidiosum* isolates. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  compared to control group (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).



**Figure 2.** Differences in the enzymatic activity among the isolates. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Column with no common superscript differ significantly (ANOVA followed by Tukey's test).



<b>210</b>	0	2	3	1	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	4	0	0	0
	0	2	3	1	1	2	0	0	3	2	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0
	0	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>216</b>	0	3	3	3	2	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	1	3	0	0	0
	0	4	3	2	3	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2	3	0	0	0
	0	2	3	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1	3	0	0	0
<b>223</b>	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>C28</b>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	4	0	0	0
	0	5	3	2	3	0	0	0	3	3	3	2	0	0	0	0	4	0	0	0
<b>C20</b>	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	2	4	2	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>220</b>	0	1	2	2	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	2	2	1	2	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1,97</b>	<b>1,54</b>	<b>1,03</b>	<b>0,23</b>	<b>0,14</b>	<b>0,11</b>	<b>0,69</b>	<b>0,14</b>	<b>1,8</b>	<b>1,74</b>	<b>0,06</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,31</b>	<b>1,34</b>	<b>0</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>

As análises foram feitas em triplicata. Coluna 1: controle; 2: fosfatase alcalina; 3: esterase; 4: esterase lipase; 5: lipase; 6: leucine arilamidase; 7: valine arilamidase; 8: cistine arilamidase; 9: tripsina; 10: alfa-quimiotripsina; 11: fosfatase ácida; 12: naftol-AS-BI-fosfohidrolase; 13:  $\alpha$ -galactosidase; 14:  $\beta$ -galactosidase; 15:  $\beta$ -glucuronidase; 16:  $\alpha$ -glucosidase; 17:  $\beta$ -glucosidase; 18: n-acetil- $\beta$ -glucosaminidase; 19:  $\alpha$ -manosidase; 20:  $\alpha$ -fucosidase. \*ATCC: American Type Culture Collection; \*\*Foram feitas somente duas repetições devido à dificuldade na obtenção de zoosporogênese.

**FIGURA SUPLEMENTAR DO ARTIGO (NÃO SUBMETIDA PARA PUBLICAÇÃO)**



**Figura 1.** Galerias do kit API-ZYM inoculadas com os isolados LAPEMI 148, LAPEMI 138 e LAPEMI C28, de cima para baixo, respectivamente.

#### 4 DISCUSSÃO

As enzimas são proteínas essenciais para o metabolismo de todos os seres vivos e têm um importante papel na degradação de matéria orgânica, na infecção de hospedeiros e na deterioração de alimentos. Enzimas também podem agir no controle dos processos bioquímicos das células vivas. Elas podem ser isoladas de animais, plantas e micro-organismos.

Sabe-se que a invasão fúngica depende da força exercida no ápice da hifa de crescimento e da secreção de enzimas degradadoras de substrato (MONEY, 2001). No caso do oomiceto *Pythium insidiosum*, os zoósporos são atraídos por uma substância presente nos tecidos de plantas ou animais, onde os mesmos se aderem para iniciar a infecção. Nessa fase, a presença de enzimas que reduzam a hidrofobicidade da superfície é uma condição *sine qua non* para início da infecção. Após o encistamento, os zoósporos desenvolvem tubos germinativos, sempre na direção do tecido animal ou vegetal (MENDOZA *et al.*, 1993). Por conseguinte, atividades enzimáticas de esterase e esterase lipase estavam presentes em todos os isolados, enquanto que lipase fez 86% dos mesmos. Após esse período, hifas de *P. insidiosum* passam a colonizar tecidos cutâneos e subcutâneos, produzindo lesões intestinais e invadindo vasos sanguíneos, podendo até mesmo proliferar no tecido ósseo (MENDOZA *et al.*, 1996).

Ravishankar *et al.*, (2001) demonstraram que a resistência de tecidos intactos excede a pressão exercida pela hifa de *P. insidiosum*, concluindo que enzimas degradadoras de tecidos têm um papel fundamental na redução da resistência tecidual, permitindo assim a penetração de tecidos animais ou vegetais. Contudo, essas enzimas exercem dupla função: reduzem a resistência do substrato e suplementam o oomiceto com nutrientes de baixo peso molecular. Muitas enzimas provavelmente exercem ambos os papéis, mas seria de maior interesse identificar aquelas que realmente agem modificando a resistência tecidual (MACDONALD *et al.*, 2002). Na tentativa de representar as condições encontradas na natureza, o presente estudo procurou demonstrar as enzimas extracelulares produzidas por *P. insidiosum* no momento em que há emissão do tubo germinativo. Mendoza *et al.* (1993) relatam que a emissão do tubo germinativo deste oomiceto se dá também nos casos em que os zoósporos encontram-se longe do tecido vegetal ou animal.

Humble (1977) demonstrou que o kit comercial API ZYM é uma ferramenta importante para detecção de atividades enzimáticas específicas, e que os padrões



obtidos podem ser úteis na taxonomia e tipificação de bactérias. Diversos estudos (BRASCH & ZALDUA 1994; FERNANADO *et al.*, 1999; SÁENZ-DE-SANTAMARÍA *et al.*, 2006; SCHALLER *et al.* 2005) confirmam sua utilidade em micologia. Resultados de Schwan-Estrada *et al.* (1997) permitem concluir que este sistema pode ser utilizado para seleção, identificação e caracterização preliminar de micro-organismos até em nível de isolados.

Shipton (1987) utilizou proteínas sonicadas obtidas do crescimento de hifas cultivadas em caldo de glicose a 30 °C por 5 dias para obter o perfil enzimático através do kit API ZYM de espécies de *Pythium* (na época acreditava-se que mais de uma espécie poderia causar a doença) isoladas de lesões de equinos. O experimento objetivou comparar o perfil enzimático de *Pythium* spp. isolados de plantas e o de isolados de equinos, cuja taxonomia ainda não estava bem definida. Para isso, inoculou os substratos do kit com a solução de proteínas numa concentração de 15 µg ml<sup>-1</sup> e incubou por 12 h a 35 °C. Todos os isolados (tanto de plantas quanto de animais) apresentaram atividade de enzimas como fosfatase alcalina, esterase, esterase lipase, fosfatase ácida, β-glucosidase, α-glucosidase. No entanto, somente um dos isolados de planta apresentou atividade de lipase, enquanto que todos os isolados obtidos de equino foram positivos para essa enzima.

Similarmente, todas as enzimas reportadas por Shipton (1987) evidenciaram atividade neste estudo, com exceção de α-glucosidase. Assim, pode-se presumir que esta seja uma enzima predominantemente intracelular, já que no presente estudo pesquisou-se apenas enzimas extracelulares, *i.e.*, secretadas no meio. Com relação à lipase, 86% dos isolados apresentaram atividade para essa enzima. Isso remete à conclusão de que, apesar das diferenças nos meios de cultura e nas técnicas utilizadas (no presente estudo utilizando zoósporos, que é a forma infectante), o padrão enzimático deste oomiceto foi semelhante em ambos os estudos, embora diversos autores tenham demonstrado que a composição do meio de crescimento pode afetar o perfil enzimático (BRASCH & ZALDUA 1994, MORISSEAU *et al.*, 1999). A composição do caldo RPMI 1640 pode ser visualizada no Anexo A.

Para realização dos testes, foi necessário padronizar um inóculo, o qual foi obtido por contagem de zoósporos de *P. insidiosum*. Segundo Pereira *et al.* (2007), este procedimento constitui-se na metodologia mais confiável para testes de suscetibilidade com este oomiceto, uma vez que zoósporos de *P. insidiosum* não produzem turbidez no meio e, portanto, o inóculo não pode ser ajustado por espectrofotometria.

Os zoósporos obtidos foram incubados em caldo RPMI 1640 RPMI contendo L-glutamina (Sigma–Aldrich,). Após 24 h de incubação a 37 °C, era evidente a presença de hifas no meio, as quais foram separadas do restante do inóculo com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril. A utilização do caldo RPMI 1640, além de permitir a padronização do inóculo, também evitou que amostras contaminadas com bactérias fossem utilizadas, através da visualização da turvação do líquido. O caldo RPMI 1640 tem sido avaliado para testes de suscetibilidade *in vitro* de leveduras, fungos filamentosos e oomicetos, demonstrando bons resultados de reprodutibilidade (GILLAMAIGNERE *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2007; ARGENTA *et al.*, 2008; CAVALHEIRO *et al.*, 2009).

Para Davis *et al.* (2006), a abundância relativa de proteínas *versus* carboidratos em tecidos animais é consistente com a preferência de *P. insidiosum* por meios de cultura enriquecidos com proteínas, seu alto nível de secreção de proteases e sua inabilidade de degradar polissacarídeos de plantas. No entanto, esses achados não corroboram com o perfil enzimático proposto por Shipton (1987), que demonstrou, utilizando o kit API ZYM, um padrão de secreção enzimática semelhante entre isolados de plantas e de animais, embora para cultivar as espécies de *Pythium* este tenha utilizado como fonte de carbono um meio composto predominantemente por glicose. O isolamento e identificação de *P. insidiosum* em amostras ambientais (SUPABANDHU *et al.*, 2008) comprovam sua já mencionada vida sapróbia (MENDOZA *et al.*, 1996).

Em relação à presença de  $\beta$ -glucosidase, encontrada em 73% dos isolados, não é possível afirmar se a presença desta é importante no ataque à celulose presente nas plantas, ou na degradação da parede celular dos zoósporos, previamente à emissão do tubo germinativo. A parede celular dos oomicetos contém grande quantidade de  $\beta(1-3)$ D-glucanas (MOORE-LANDECKER, 1996; PEREIRA *et al.*, 2008), onde a ação de  $\beta$ -glucosidase seria fundamental na hidrólise das ligações  $\beta(1-3)$  das glucanas (FRY, 1995).

A análise filogenética dos isolados de *P. insidiosum* utilizados no presente estudo demonstra que há distâncias evolucionárias entre os mesmos. Está em andamento no Laboratório de Pesquisas Micológicas da Universidade Federal de Santa Maria um estudo para caracterização destas diferenças em nível molecular. Dentro dessa temática, Cavalheiro *et al.* (2009) e Argenta *et al.* (2008) demonstraram variabilidade entre a susceptibilidade desses isolados *in vitro* frente a diferentes antifúngicos. Assim, diferença estatística na atividade enzimática entre os isolados era esperada. Contudo,

diferenças nas atividades de  $\beta$ -glucosidase, esterase, naftol-AS-BI-fosfohidrolase e fosfatase ácida observadas através do uso do teste de Tukey não foram conclusivas. Um estudo com um número maior de isolados seria necessário para elucidar quais atividades enzimáticas realmente diferem entre os isolados.

A repetição deste experimento utilizando os mesmos isolados de *P. insidiosum*, contudo em diferentes temperaturas de incubação (por exemplo, 25 °C) e em diferentes fontes de carbono (por exemplo, colágeno), poderia auxiliar no entendimento de quais enzimas exercem função na patogenicidade deste oomiceto. Além disso, a inclusão de isolados ambientais também seria de grande valia, uma vez que estes estão sendo identificados a partir de técnicas moleculares específicas para *P. insidiosum*. E, num pensamento mais ousado, a continuação das pesquisas enzimáticas com o kit API ZYM poderia envolver isolados deste oomiceto após passagem por antifúngicos convencionais, acrescidos em meio de cultura, verificando a partir disso se há relação de alguma dessas enzimas frente às drogas utilizadas.

## 5 CONCLUSÕES

- 1- Zoósporos de *Pythium insidiosum* cultivados em caldo RPMI 1640 apresentaram secreção de enzimas hidrolíticas, sendo estas pertencentes principalmente ao grupo das fosfohidrolases e éster hidrolases;
- 2- Fosfatase alcalina, esterase, esterase lipase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase foram encontradas em 100% dos isolados de *P. insidiosum*, enquanto que lipase e  $\beta$ -glucosidase foram detectadas em 86 e 80% dos isolados, respectivamente.
- 3- Foram detectadas diferenças significativas na atividade enzimática de  $\beta$ -glucosidase, esterase, naftol-AS-BI-fosfohidrolase e fosfatase ácida entre os isolados de *P. insidiosum*, comprovando-se a variabilidade intraespécie, já relatada por outros autores.

## 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.
- ALFARO, A.A. & MENDOZA, L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. **Equine Veterinary Journal**. v. 22. n. 4, p. 295-297, 1990.
- ANGULO-VALADEZ, C.E. et al. Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. **Veterinary Parasitology**. v. 149, p.117-25, 2007.
- ARGENTA, J.S. et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 52, p. 767-769, 2008.
- BISSONNETTE, K.W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 29, p. 39-44, 1991.
- BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.
- BRASCH, J.; ZALDUA, M. Enzyme patterns of dermatophytes. **Mycoses**. v. 37, p. 11-16, 1994.
- 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.; GROOTERS, A.M.; AQUILAR, R.F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 16, p. 567-571, 2004.
- CASAL, M., LINARES, M.J. Contribution to the study of the enzymatic profiles of yeast organisms with medical interest. **Mycopathologia**. v. 81, p. 155-159, 1983.
- CAVALHEIRO, A.S. et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**. v. 137, p. 408-411, 2009.
- CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 201, n. 2, p. 310-312, 1992.
- 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.
- CHAIPRASERT, A. et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**. v. 33, n. 6, p. 317-323, 1990.

DAVIS, D.J. et al. Relationship between temperature optima and secreted protease activities on three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. **Mycological Research**. v. 110, p.96-103, 2006.

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.

DYKSTRA, M.J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**. v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.

EATON, S.A. Osseous involvement by *Pythium insidiosum*. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 15, p. 485-490, 1993.

ENGLISH, P.B. & FROST, A.J. Phycomycosis in a dog. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 291-292, 1984.

FERNANADO, P.H., PANAGODA, G.J., SAMARANAYAKE, L.P. The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. **APMIS**. v. 107, p. 1034-1042, 1999.

FISCHER, J.R. et al. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 6, p. 380-382, 1994.

FOIL, C.S.O. et al. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium spp.* **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 20, p. 959-966, 1984.

\_\_\_\_\_. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**. p. 57-63, 1996.

FRY, S.C. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 46, p. 497-520, 1995.

GABRIEL, A.L. et al. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 12, p. 583-587, 2008.

GIL-LAMAIGNERE, C. et al. Effect of media composition and *in vitro* activity of posaconazole, caspofungina and voriconazole against zygomycetes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 55, p. 1016-1019, 2005.

GONZÁLES, H.E. et al. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. **Revista ICA**. v. XIV, n. 2, p. 115-122, 1979.

GROOTERS, A.M. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 16, n. 2, p. 142-146, 2002.

GROOTERS, A.M. & GEE, M.K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 16, n. 2, p. 147-152, 2002.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 33, p. 695-720, 2003.

HENDRIX, J.W. Sterols in growth and reproduction of fungi. **Annu Rev Phytopathol**. v. 8, p. 111-130, 1970.

HNILICA, K.A. Difficult dermatologic diagnosis. Pythiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 212, n. 8, p. 1192-1193, 1998.

HUBERT, J.D. & GROOTERS, A.M. Treatment of equine pythiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 24, n. 10, p. 812-815, 2002.

HUMBLE, M.W., KING, A., PHILLIPS, I. API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. **Journal of Clinical Pathology**. v. 30, p. 275-277, 1977.

IMWIDHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**. v. 70, p. 558-560, 1994.

JAEGER, G.H.; ROTSTEIN, D.S.; LAW, J.M. Prostatic pythiosis in a dog. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 16, p. 598-602, 2002.

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

LEAL, A.T. et al. Pitiose – Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**. v. 31, n. 4, p. 735-743, 2001b.

LITTLE, C.B. & KABAY, M.J. Fungal granuloma in a horse. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 298-300, 1984.

MACDONALD, E. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology**. v. 37, p. 245-249, 2002.

McMULLAN, W.C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 170, p. 1293-1297, 1977.

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.; ALFARO, A.A.; VILLALOBOS, J. Bone lesions caused by *Pythium insidiosum* in a horse. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 26, p. 5-12, 1988.

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

MENDOZA, L., MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* de Cock *et al.* 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987. **Mycoses**. v. 32, n. 2, p. 73-77, 1989.

MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiososi in horses. **Mycopathologia**. v. 119, p. 89-95, 1992.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. 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.; 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. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.

MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**. v. 21, p. 2797-2804, 2003.

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

MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**. v. 57, p. 377-382, 1981.

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.; OLCOTT, B.M.; ARCHER, M. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 186, n. 9, p. 984-986, 1985.

MONEY, N.P. Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. **Mycological Research**. v. 110, 96-103, 2001.

MONTEIRO, A.B. **Imunoterapia da pitiose eqüina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo**



*Pythium insidiosum*. 1999. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 1999.

MOORE-LANDECKER, J. Zoosporic Fungi. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentals of the Fungi**. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Cap. 3, p. 33-79.

MORISSEAU, C. et al. Multiple epoxide hydrolases in *Alternaria alternata* and their relationship to medium composition and host-specific toxin production. **Applied Environmental Microbiology**. v. 65, p. 2388–95, 1999.

PAPINI, R., MANCIANTI, F. Extracellular enzymatic activity of *Microsporium canis* isolates. **Mycopathologia**. v. 132, p. 129-132. 1996.

PENNACCHIA, C. et al.. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, 1919-1928, 2008.

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

\_\_\_\_\_. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**. v. 38, p. 143-147, 2008.

PÉREZ, R.C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**. v. 109, n. (1-2), p. 121-128, 2005.

PESAVENTO, P.A. et al. Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Veterinary Pathology**. v. 45, p. 538-541, 2008.

PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis. **Emerging Infectious Disease**. v. 12, n. 3, p. 517-518, 2006.

RAKICH, P.M.; GROOTERS A.M.; TANG K. Pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 17, p. 262-269, 2005.

RAVISHANKAR, J.P., DAVIS, C.M., DAVIS, D.J. et al. 2001. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 34, p. 167-175, 2001.

REIS, J.L. et al. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**. v. 96, p. 289-295, 2003.

RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Disease**. v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; BOSSCHE, H.V. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** v. 26, p. 31-53, 2003.

SÁENZ-DE-SANTAMARÍA, M., GUI SANTES, J.A., MARTÍNEZ, J. Enzymatic activities of *Alternaria alternata* allergenic extracts and its major allergen (Alt a 1). **Mycoses**. v. 49, p. 288-292, 2006.

SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**. v. 141, p. 123-125, 1998.

SANTURIO, J.M.; LEAL, A.T.; MONTEIRO, A.B. Pythiose. In: LEFÈRE, P.C.; BLANCOU, J.; CHERMETTE, R. **Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires du Bétail – Europe et Régions Chaudes**. Paris: Editions TEC & DOC et Editions Médicales Internationales. v. 2, Cap.100, p. 1231-1241, 2003a.

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

\_\_\_\_\_. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006a.

\_\_\_\_\_. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

\_\_\_\_\_. Granulomatous rhinitis in sheep associated with *Pythium insidiosum* infection. **The Veterinary Record**. v. 163, p. 276-277, 2008.

SCHALLER, M., BORELLI, C., KORTING, H.C., HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**. v. 48, p. 365-377, 2005.

SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored. **Mycologia**. v. 95, n. 2, p. 200-208, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. et al. Caracterização enzimática de fungos pelo sistema Api-Zym. **Fitopatologia Brasileira**. v. 22, n. 3, p. 392-395, 1997.

SEDRISH, S.A. et al. Adjunctive use of a neodymium:yttrium-aluminum garnet laser for treatment of pythiosis granulomas in two horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 211, n. 4, p. 464-465, 1997.

SHENEP, J.L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Disease**. v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

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.

\_\_\_\_\_. *Pythium destruens* sp. nov., an agent of equine pythiosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 25, p. 137-151, 1987.

SUPABANDHU, J., FISHER, M.C., MENDOZA, L. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**. v. 46, p. 41-52, 2007.

TABOSA, I.M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Veterinary Pathology**. v. 41, p. 412-415, 2004.

THITITHANYANONT, A. et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Disease**. v. 27, n. 6, p. 1394-1400, 1998.

THOMAS, R. & LEWIS, D. Pythiosis. **Selecciones Veterinarias**. v. 8, n. 3, p. 313-319, 1998.

TRISCOTT, J.A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.

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.

WEBSTER, J., WEBER, R.W.S. Introduction to fungi. In: \_\_\_\_\_. *Straminipila: Oomycota*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Cap. 4 e 5, p. 67-125.

**ANEXOS**

**ANEXO A - Características do meio RPMI 1640**

## RPMI 1640

**DEFINIÇÃO:** É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular.

**ACÇÃO:** Age como uma solução nutritiva em cultivo celular.

**INDICAÇÃO:** Destina-se à cultura de células humanas e de outros animais. Este meio é fornecido na forma desidratada, em pó ou líquido. Na forma de pó ele tem a vantagem de se manter estável por mais 24 meses se conservado bem fechado e em geladeira. Outra grande vantagem do meio em pó é a constância de resultados quando se programam culturas celulares a longo prazo, utilizando nesse caso um mesmo lote. O MEIO RPMI 1640, por não ter timidina na sua composição, é muito utilizado para obter a sincronização da divisão celular.

**VANTAGENS:** Testado em pelo menos três linhagens diferentes, sendo sempre determinado o seu pH e osmolaridade, cada lote só é liberado se estiver dentro dos limites adequados, além de promover um ótimo crescimento celular.

### CARACTERÍSTICA FISIO-QUÍMICAS:

- Aspecto : Pó róseo e homogêneo
- Tamanho das Partículas : aproximadamente 20 microns
- Solubilidade : solução límpida na concentração de uso (1x)
- pH a 25oC (Sem NaHCO<sub>3</sub>) : 8,0 + 0,5
- pH a 25oC (ComNaHCO<sub>3</sub>) : 8,1 + 0,5
- Osmolaridade (sem NaHCO<sub>3</sub>) : 246 + 5%
- Osmolaridade (com NaHCO<sub>3</sub>) : 290 + 5%

**CONSERVAÇÃO:** Estocar o meio em pó ou preparado líquido entre 2 à 6oC. Se essas condições não forem mantidas, poderão ser observadas alterações do tipo:

1. Mudança de Cor
2. Granulações
3. Insolubilidade
4. Alteração de pH
5. Incapacidade de manter a integridade celular sob condições normais.

**PREPARAÇÃO:** O MEIO RPMI 1640 em pó é extremamente higroscópico, devendo ser protegido do meio ambiente. Não são recomendadas preparações de concentrações maiores que aquelas especificadas, devido a grande possibilidade de formação de precipitados.

- 1.) Medir aproximadamente 90% do volume a ser preparado de água tridestilada (15 - 20oC).
- 2.) Adicionar lentamente o pó sob agitação constante. **NÃO AQUEÇA A ÁGUA.**
- 3.) Depois que o pó estiver totalmente dissolvido, acrescentar por litro 2,0g de bicarbonato de sódio 5,6%.
- 4.) Acrescentar antibióticos ou outras substâncias que julgar necessário.
- 5.) Poder-se-á acertar o pH conforme o desejado, utilizando-se HCl 1N ou NaOH 0,1N, ou ainda, gaseificando-se com CO<sub>2</sub>.
- 6.) Completar o volume com água tridestilada e esterilizar por filtração em membranas de 0,22m, utilizando pressão positiva.

## COMPOSIÇÃO MEIO RPMI 1640

SAIS INORGÂNICOS		mg/L		
			L-triptofano	5,00
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	100,00	L-prolina	20,00
	KCL	400,00	L-tirosina	28,00
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100,00	L-serina	30,00
	NaCl	6.000,00	L-valina	20,00
	NaHCO <sub>3</sub>	2.000,00	L-treonina	20,00
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	800,00	VITAMINAS	
			biotina	0,200
			pantotenato de cálcio	0,250
			cloreto de colina	3,000
			ácido fólico	1,000
			inositol	35,000
			nicotinamida	1,000
			ácido p-aminobenzoico	1,000
			piridoxina.HCL	1,000
			riboflavina	0,200
			tiamina.HCL	1,000
			vitaminaB12	0,005
			OUTROS COMPONENTES	
			glicose	2.000,00
			glutathione	1,00
			vermelho de fenol	5,00

