

Atividade *in vitro* do gás ozônio sobre isolados de *Pythium insidiosum* oriundos de equinos

AUGUSTO DUARTE BROD¹; CAROLINE QUINTANA BRAGA²; ISABELLA RODRIGUES DE ANDRADE; HENRIQUE RATZZ⁴; CRISTINA GOMES ZAMBRANO⁵; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – adbrods@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolineqbraga@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – andradeisabella52@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – henriqueraatz@gmail.com

⁵Universidade Federal de pelotas – cris-zambrano@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – danielabraye@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático e patógeno para mamíferos, Causa a pitiose, uma doença emergente, de rápida evolução, difícil tratamento e que oferece risco de vida aos indivíduos infectados (Mendoza; Vilela, 2013). Embora esta enfermidade seja descrita em vários países, o maior número de casos em humanos é relatado na Índia e Tailândia (YOLANDA & KRAJAEJUM, et al. 2022). Já em animais, incluindo equinos e caninos, a maioria dos casos são descritos nos EUA e no Brasil (YOLANDA & KRAJAEJUM, et al. 2022).

Nos equinos, a pitiose é frequente e caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões cutâneas/subcutâneas fibrogranulomatosas, ulcerativas, que evoluem rapidamente, formando grandes massas teciduais de aparência tumoral. As lesões são geralmente únicas e localizadas em áreas do corpo nas quais os animais estão em maior contato com a água, assim como, regiões inferiores dos membros pélvicos e torácicos, região abdominal ventral, peito, pescoço, face e lábios. Em todos os relatos da pitiose em equinos não há histórico de cura espontânea (PEREIRA, MEIRELES, 2023).

Em equinos, bem como na maioria dos hospedeiros acometidos, são relatadas dificuldades no tratamento da enfermidade. A ausência de ergosterol na membrana plasmática dos oomicetos explica parcialmente a pobre responsividade aos fármacos antifúngicos que atuam na síntese desta molécula (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Além disso, recidivas pós-cirúrgicas e ausência de resposta à imunoterapia também foram relatadas (GAASTRA et al., 2010)

Embora, nos últimos anos várias pesquisas tenham demonstrado a ação inibitória de diferentes compostos sobre *P. insidiosum* (PEREIRA et al., 2007; LORETO et al., 2018; IANISKI et al., 2021; VALENTE et al., 2020; FONSECA et al., 2015; STIBBE et al., 2022; IANISKI et al., 2023), constata-se que é imprescindível estudar outras e/ou novas opções terapêuticas que possam ser integradas em protocolos a serem aplicados para o tratamento das diferentes formas clínicas da pitiose em animais e humanos. Neste contexto, a ozonioterapia é uma técnica da medicina integrativa que agrega a utilização de

95% de O₂ e 5% de O₃, vem se destacando como uma terapia integrativa no tratamento de diversas enfermidades infecciosas, incluindo doenças cutâneas de animais e humanos (ZENG; LU, 2018, LIU et al., 2022).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação anti-*P. insidiosum*, bem como verificar as alterações causadas pela mistura gasosa O₃-O₂ sobre hifas deste importante patógeno emergente que afeta mamíferos.

2. METODOLOGIA

Para avaliar o efeito do gás ozônio sobre o micélio de *P. insidiosum*, seis isolados do oomiceto foram testados, incluindo uma cepa padrão (CBS 1015.55) e cinco isolados clínicos oriundos de equinos (SISGEN A139392). Todos os isolados clínicos foram caracterizados morfológicamente e molecularmente de acordo com Azevedo et al. (2012) e Weiblen et al. (2019).

Os isolados de *P. insidiosum* foram previamente cultivados em ágar levedura a 0,1%, e incubados a 37°C/48 horas. Posteriormente, blocos de ágar a partir dessas culturas foram transferidos para 50 mL de caldo Sabouraud e incubados sob agitação (120 rpm) a 37°C/72 horas. Os micélios foram drenados por filtração e lavados com água destilada estéril (ADE). Uma alíquota de 300 mg, o que equivale a transmitância de 50%–55% a 530 nm, de cada micélio foi transferida para tubos tipo Falcon e acrescido 30 mL de ADE.

O gás ozônio, ajustado na concentração de 60 µg O₃ /mL no gerador de ozônio Medplus V (Phlilozon®), foi insuflado em borbulhamento no interior dos frascos durante 5 minutos. Após 15 minutos, fragmentos do micélio ozonizado foram cultivados em ágar levedura 0,1% e incubados a 37°C durante 96 horas. Posteriormente, as suspensões de micélio expostas ao gás ozônio foram incubadas a 37°C/24, 48 e 72 horas. A cada tempo de incubação das suspensões, fragmentos de micélio foram retirados e cultivados em ágar levedura 0,1%/37°C e incubados por 96 horas. Os cultivos foram avaliados diariamente e a leitura baseou-se no crescimento de hifas a cada 24 horas, durante 96 horas de incubação. O mesmo protocolo foi utilizado para as suspensões de micélio controle (sem exposição ao gás ozônio). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Hifas de *P. insidiosum* (CBS 1015.55) expostas ao gás ozônio (60 µg O₃/mL/5 minutos) e hifas controle (sem exposição ao gás) foram preparadas para a MEV (Microscopia eletrônica de varredura) de acordo com o protocolo descrito por Valente et al. (2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia empregada neste experimento revelou que o gás ozônio causou a completa inibição do crescimento micelial de *P. insidiosum*. Por outro lado, a partir das suspensões controle de hifas, evidenciou-se o crescimento micelial do micro-organismo em 24 horas de incubação a 37°C. Resultados

similares foram relatados por Ferreira et al. (2021) e Carrijo et al. (2022) ao utilizarem gás ozônio em concentrações de 32, 52 ou 72 $\mu\text{g O}_3$ por 30 minutos sobre o micélio de *P. insidiosum*.

Na MEV foi possível evidenciar que as hifas de *P. insidiosum* não expostas ao gás ozônio (controle) apresentavam-se íntegras e com aspecto túrgido (Figura. 1A). Por outro lado, as hifas tratadas estavam murchas e destruídas evidenciando várias cavitações ao longo da parede celular (Figura. 1 B).

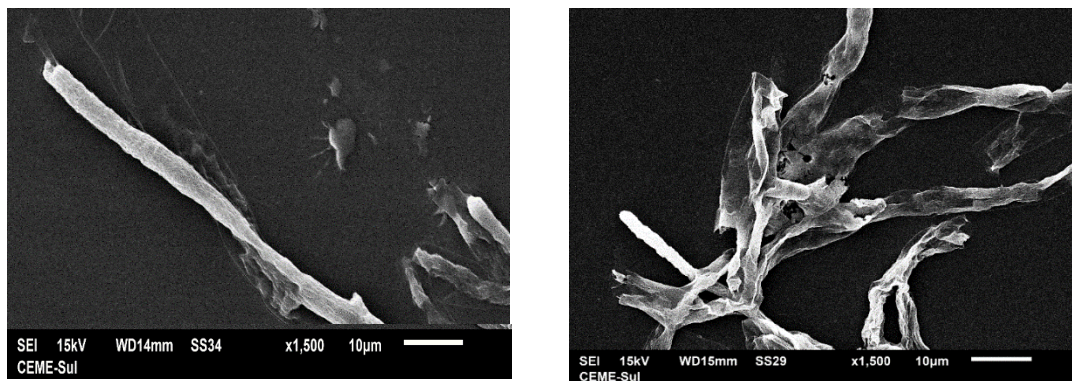


Figura 1: Hifas de *Pythium insidiosum* (CBS 101555) visualizadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A) Controle (sem tratamento): Hifa íntegra de aspecto túrgido. B) Hifa tratada (60 $\mu\text{g O}_3/\text{mL}$). Hifas murchas e destruídas mostrando cavitações ao longo da parede celular.

Liu et al. (2022) relataram que o ozônio tem efeitos oxidativos sobre a célula fúngica e ao penetrar no citoplasma, interrompe as funções celulares e inibe a produção de enzimas, causando o extravasamento de nutrientes. Assim, acredita-se que a inibição do crescimento, bem como as lesões nas hifas observadas na MEV tenham sido ocasionadas pela ação oxidante do ozônio.

Na maioria das espécies acometidas, a pitiose tem alta letalidade, pois ainda não há um protocolo estabelecido para o tratamento da doença (VALENTE et al., 2020). As terapias convencionais, incluindo o uso de fármacos, imunoterapia e a intervenção cirúrgica nem sempre são totalmente efetivas e muitas vezes falham para a resolução das lesões (PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2012; Fonseca et al., 2015; VALENTE et al., 2020). Desta forma, a inclusão de terapias integrativas e complementares, como exemplo a ozonioterapia, aos protocolos terapêuticos da pitiose são desejáveis.

4. CONCLUSÕES

Considerando os resultados preliminares deste trabalho *in vitro*, conclui-se que o gás ozônio tem atividade anti-*P. insidiosum* determinando lesões irreversíveis nas hifas deste importante oomiceto patógeno. Este fato sugere que a ozonioterapia pode ser futuramente integrada aos protocolos terapêuticos da pitiose equina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- YOLANDA, H. & KRAJAEJUN T. Global Distribution and Clinical Features of Pythiosis in Humans and Animals. **Journal of Fungi**. v. 8,n.182, 2022.
- PEREIRA, D. I. B. et al. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 143–147, fev. 2007.
- STIBBE, P.C. Mefenoxam and pyraclostrobin: toxicity and *in vitro* inhibitory activity against *Pythium insidiosum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 75, n.5, p.13831388, 2022.
- MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**. v. 104, n. 1, p. 59-62, 1988.
- VALENTE, J.S.S. et al. Biogenic silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis Bio-AgNP in pythiosis therapy. **Medical Mycology**. V.0, p. 1-6, 2020.
- VALENTE J.S.S, et al., *In vitro* anti- *Pythium i nsidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v.57, n.7, p.858–863, 2019.
- VALENTE J.S.S, et al., *In vitro* anti- *Pythium i nsidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v.57, n.7, p.858–863, 2019.
- AZEVEDO, M. I. et al. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1–2, p. 141–148, 2012.
- FONSECA A.O. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Vet Microbiol**. 178: 265–269, 2015.
- IANISKI, L. B. et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 67–73, 4 jan. 2021.
- IANISKI, L. B. et al. Oomycidal activity of polypyrrole nanoparticles against *Pythium insidiosum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 23, n.1, 2023.
- LORETO, E. S. et al. Efficacy of Azithromycin and Miltefosine in Experimental Systemic Pythiosis in Immunosuppressed Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. e01385-18, 21 dez. 2018.
- ARGENTA, J.S. et al. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v.157, p.137-142, 2012.
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**. v. 146, n.1-2, p. 1-16, 2010.
- LIU L, et al. Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. **Int Wound J**. p. 1–10, 2022.
- WEIBLEN C. et al. Genotyping of South American clinical isolates of *Pythium insidiosum* based on single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR. **Ciência Rural**. v. 49, n.e2018-0744, 2019.
- ZENG, J., AND J. LU. Mechanisms of Action Involved in Ozone-therapy in Skin Diseases. **International Immunopharmacology**. v.56, p.235–41, 2018.