ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA DE *PYTHIUM INSIDIOSUM* APÓS AÇÃO INIBITÓRIA DO ANTIBACTERIANO AZITROMICINA¹

Lara Baccarin Ianiski², Paula Cristina Stibbe³, Carla Weiblen⁴, Aline Fontanella Maciel⁵, Daniela Isabel Brayer Pereira⁶, Sônia de Avila Botton⁷

¹ Pesquisa científica

² Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), CCS, UFSM, RS, Brasil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), UFSM, RS, Brasil.

⁵ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, RS, Brasil.

⁶ Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS, Brasil.

⁷ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), UFSM. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), UFSM. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, RS, Brasil.

Introdução – *Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático, com a capacidade incomum de patogenicidade em mamíferos, principalmente equinos, caninos e seres humanos. A capacidade de infecção deste eucarioto resulta em uma enfermidade denominada pitiose, que é uma doença granulomatosa crônica, geralmente fatal, de distribuição mundial, e que apresenta diferentes características clínicas em cada espécie, dificultando o seu diagnóstico. *P. insidiosum* possui características morfofisiológicas que o distingue dos membros do Reino Fungi, especialmente a via de biossíntese de ergosterol incompleta, principal alvo de ação de fármacos antifúngicos existentes, tornando-o pouco suscetível às terapias quimioterápicas tradicionais. Por consequência, o tratamento de infecções causadas por esse micro-organismo é limitado, sendo muitas vezes necessário a combinação de diferentes terapias, como a imunoterapia, quimioterapia e procedimentos cirúrgicos. No entanto, estudos avaliando a ação inibitória *in vitro* aos diferentes antimicrobianos empregados no controle de bactérias e fungos, demonstraram a suscetibilidade de *P. insidiosum*.

Objetivos – Este estudo objetivou verificar o efeito inibitório do antibacteriano azitromicina sobre o crescimento das hifas do oomiceto patógeno *P. insidiosum*.

Metodologia – Utilizou-se amostra de cultivo hifal de cepa padrão de *P. insidiosum* (CBS 575.85) em concentração subletal de 16 mg/L de azitromicina, selecionado previamente a partir dos testes de suscetibilidade *in vitro*. Como controle da análise, empregou-se hifas de *P. insidiosum* (CBS 575.85) sem tratamento farmacológico. Para o preparo das lâminas de microscopia eletrônica de transmitância (MET), as hifas foram drenadas do meio de cultura, fixadas em 1mL de glutaraldeído e mantidas a 4°C overnight. Em seguida, foram lavadas duas vezes com água destilada estéril (dH₂O) e, posteriormente, três vezes com tampão de cacodilato de sódio (0,1 M) e sacarose (0,2

M), pH 7,4. As amostras foram ressuspensas em tampão de ósmio e cacodilato de sódio (0,4 M, pH 7,4) por 50 minutos e os sedimentos foram lavados com dH₂O e banhados sucessivamente em diferentes concentrações de álcool (50%, 70% e 90%) no período de 5 minutos cada banho. Posteriormente, as amostras foram submetidas a três banhos de álcool (100%) de 10 minutos cada, seguidos de duas lavagens com acetona por 10 minutos e logo após, foram submetidas a um banho em solução de 1mL de acetona e 1mL de solução de resina. As amostras foram adicionadas à resina e mantida em agitação por uma hora. Cortes ultrafinos de 60nm e semifinos de 1µm foram feitos no tampão de cacodilato Leica Ultracut UCT, e as imagens geradas por MET foram observadas em um microscópio JEOL JEM-1400.

Resultados – A azitromicina demonstrou efeito inibitório frente a *P. insidiosum* e sua ação promoveu alterações morfofisiológicas sobre o crescimento das hifas deste microrganismo. Observou-se, pela MET, uma modificação de membrana plasmática e organelas intracelulares, com acúmulo de ribossomos e ausência de mitocôndrias.

Conclusões – Esta pesquisa, demonstra o efeito da azitromicina sobre as hifas de *P. insidiosum*. Contudo, outras análises morfológicas devem ser realizadas a fim de elucidar com mais detalhes o mecanismo de ação deste fármaco antibacteriano frente a este importante oomiceto patogênico. Adicionalmente, estudos *in vivo* também se tornam necessários para comprovar o potencial terapêutico deste fármaco na pitiose clínica.

Palavras-chave – Pitiose; Oomiceto; Teste de suscetibilidade; Alterações morfológicas.

Agradecimentos – Ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM) e agências de fomento à pesquisa: CNPq, FAPERGS/PqG e CAPES (código 001).