

ESTUDO ECOLÓGICO DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM DIFERENTES TIPOS DE SOLO: CULTIVO, DETECÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE CONÍDIAS. Gisela Ramos Terçarioli, Eduardo Bagagli, Gabriela Martins Reis, Raquel Cordeiro Theodoro, Sandra Bosco, Virgínia Richini. – Microbiologia – Ciências Biológicas – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu – Campus de Botucatu.

A Paracoccidioidomicose (PCM), doença causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é a micose sistêmica de maior importância na América Latina (WANKE, B, 1994). Embora já se saiba que a principal rota de infecção ocorra pela inalação de conídias (propágulos infectantes) presentes no ar, a falta de surtos epidêmicos da doença aliada ao seu longo período de latência geram circunstâncias que dificultam a determinação precisa do local de ocorrência da infecção.

O habitat natural do *P. brasiliensis* ainda é desconhecido, embora alguns indícios ecológicos apontam o solo como sendo o habitat saprofítico do patógeno, já que existem alguns registros do isolamento do fungo em materiais de solo (RESTREPO, A., 2001). Além disso, a descoberta de uma alta incidência de infecção do *P. brasiliensis* no tatu *Dasypus novemcinctus*, que vive no solo, e que tanto o homem quanto os tatus estão se infectando pelos mesmos “ecopatogenotipos”, oferecem novas perspectivas para o estudo e identificação do micro-nicho deste patógeno (BAGAGLI, E., 2003).

Numa tentativa de identificar aspectos ecológicos da doença, um trabalho baseado na distribuição de PCM na área hiper-endêmica de Botucatu, São Paulo – Brasil utilizando-se da tecnologia de Geographic Information System (GIS), demonstrou que ocorre uma maior prevalência de casos de PCM em regiões de solo argiloso (SIMÕES, L.B., 2004). A partir de então, o presente trabalho teve por objetivo compreender melhor a relação do fungo *P. brasiliensis* com diferentes tipos de solos. Assim sendo, dados que corroborem para um maior entendimento da ecologia do fungo no solo, podem proporcionar ferramentas para a identificação de fatores de riscos ambientais, as quais são importantes para a tomada de medidas preventivas contra novas infecções.

Para isso, amostras de solo textura argilosa, média e arenosa, tanto de superfície quanto de tocas de tatu, foram coletadas na região hiper-endêmica de PCM em Botucatu (São Paulo, Brasil) e na Ilha do Serrito (São Manuel, São Paulo, Brasil), tomando como base mapas de tipos de solo disponíveis. Todos os locais de coletas foram georreferenciados com GPS (Global Positioning System). Amostras de solos foram também enviadas ao Departamento de Solos da Faculdade de Ciências Agrônômicas /UNESP-Botucatu, para se fazer análises física e de macronutrientes das mesmas.

Parte das amostras foram autoclavadas (120°C por 30 minutos) e utilizadas para o cultivo direto de *Paracoccidioides brasiliensis* em solo. Cinco isolados fúngicos (T5LN1, T9B1, T10B1, BT84 e D01) foram semeados na sua forma leveduriforme em placas contendo cerca de 50g de solo (textura média, arenosa e argilosa) saturado com água destilada e estéril. Da mesma maneira, cultivou-se três isolados (T5LN1, T9B1 e BT84) em placas contendo solos argiloso, arenoso e textura média, contendo, cada um, uma condição de umidade diferente. Para isso, determinou-se a Capacidade de Campo (CC) de cada tipo de solo no Laboratório de Física do Solo da Faculdade de Ciências Agrônômicas /UNESP. Feito isso, o solo foi seco em estufa a 120°C durante 24 horas e 50g deste solo foi colocado em uma placa, a qual passou por um novo processo de autoclavação. Adicionou-se na placa o volume de água destilada estéril de forma a obter a umidade desejada: baixa (volume igual à metade da CC), média (volume igual à CC) e alta (solo saturado). Todas as placas foram mantidas a 25°C durante oito semanas, onde o crescimento fúngico foi observado.

Prepararam-se meios de cultura Agar Extrato de Solo (AES), GPYA (Glicose, peptona, extrato de levedura e Agar) e BDA (Batata Dextrose Agar) acrescidos de extrato de solo (ES) arenoso, argiloso e textura média. Os ES foram preparados misturando-se 1kg de solo com 1L de água destilada, e em seguida filtrando a mistura em algodão e gaze e ajustando-se o pH para 7,0. Os isolados foram cultivados em todos esses meios de cultura (quatro fragmentos por placa), e, além de análise de crescimento, foram feitas lâminas através de técnicas de microcultivo e da fita adesiva transparente (Durex, 3M), as quais foram coradas com o corante lactofenol-azul-algodão. Foi feita

medição e contagem de conídias por campo (aumento de 100x) através da utilização de fotomicroscópio e do software Leica Qwin Lite 2.5.

A detecção molecular foi feita a partir da extração de DNA do patógeno em amostras de solo através do Kit comercial Fast DNA® Spin Kit for Soil (Q-BIOgene). O material foi quantificado em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio. Realizou-se Nested PCR da região ITS com os *outer primers* ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e com os *inner primers* PbITSE (GAGCTTTGACGTCTGAGACC) e PbITSR (AAGGGTGTGTCGATCGAGAGAG), descritos por THEODORO et al. 2005. Os produtos de PCR foram identificados em gel de agarose 1,5% acrescido de brometo de etídio.

Os resultados referentes às análises de crescimento em solo revelaram que o *P. brasiliensis* é capaz de crescer em solo arenoso e argiloso de maneira semelhante. Além disso, notou-se um maior crescimento do fungo em solos contendo um alto teor de umidade (saturados em água) do que em solos com pouca água. O patógeno não cresceu particularmente em duas amostras de solo textura média, as quais, segundo as análises de macronutrientes, possuíam um alto valor de alumínio trocável (H+Al). Os resultados das análises de macronutrientes também mostraram que o crescimento do fungo é bastante flexível com relação a diversos fatores, tais como o pH, que variou de 3,9 a 6,0, a matéria orgânica, com variação de 19 a 63g/dm³, a saturação em bases, com variação de 14 a 83% e a presença de cátions (Ca, K e Mg). O crescimento do patógeno em meio de cultura AES foi consideravelmente menor do que o crescimento em meios GPYA e BDA, que são mais ricos, e a presença de ES de diferentes texturas nesses meios não afetou o desenvolvimento do fungo. Tanto no cultivo diretamente sobre o solo, quanto no cultivo em meios de cultura, a velocidade de crescimento e morfologia micelial de cada cepa variou. Observou-se que o isolado BT84 não cresceu em solo e foi o que obteve menor desempenho em AES. Do contrário, o isolado T9B1 foi o que melhor se desenvolveu em todos os tratamentos, enquanto que os outros isolados tiveram um desempenho mediano.

Lâminas obtidas a partir do cultivo dos isolados em meios de cultura AES e GPYA acrescido de ES (argiloso, arenoso e textura média) revelaram que somente os isolados T9B1, D01 e BT85 produziram conídias, inclusive em alta quantidade. Os isolados produziram um número muito maior de conídias quando cultivados em meio de cultura AES (média de 109 por campo) do que em meio GPYA com ES (média de 14 por campo). A confecção de lâminas por meio da técnica da fita adesiva possibilitou a visualização de um maior número de conídias do que a técnica de microcultivo. Os valores das medidas das conídias foram em média 2.88µm de largura, 3.49µm de comprimento e 9.09µm² de área.

A detecção molecular de *P. brasiliensis* em solo revelou que as reações de Nested-PCR foram positivas para a maioria das amostras coletadas em tocas de tatu (tanto em solo arenoso quanto argiloso) enquanto que não houve amplificação positiva em amostras de solo superficial.

Por meio dos resultados obtidos neste projeto conclui-se que a textura do solo não é um fator determinante do crescimento de *P. brasiliensis*, já que o patógeno pôde crescer de forma semelhante tanto em solo argiloso quanto em solo arenoso. O mesmo foi constatado quando o fungo foi cultivado nos meios de cultura BDA, GPY e AES acrescidos de extratos de solo.

O fungo cresce melhor em solos que contém alto teor de umidade, enquanto que solos com altas quantidades de H+Al e baixa porcentagem de saturação em bases (V%), representam condições inibitórias ao crescimento do *P. brasiliensis*.

Os resultados obtidos por detecção molecular indicam que o patógeno deve ocorrer com maior frequência no interior de tocas de tatus, ao invés de solos de superfície, o que o associa mais ainda ao seu hospedeiro natural, o tatu, além de produzirem dados que evidenciam potenciais áreas de riscos para infecção com o patógeno.

Referências Bibliográficas

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S.M.G. et al.. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v.41, n.3, p.217-223, jun. 2003.

RESTREPO, A., McEWEN, J.G., CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v.39, n.3, p. 233-241, jun. 2001.

SIMÕES, L.B.; MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E. Distribution of Paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses. **Med. Mycol.**, v.42, n.6, p.517-523, dec. 2004.

THEODORO, R.C.; CANDEIAS, J.M.; ARAUJO JR., J.P.; BOSCO, S.M.; MACORIS, S.A.; PADULA, L.O.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med. Mycol.**, v.43, n.8, p.725-729, dec. 2005.

WANKE, B.; LONDERO, A.T.; Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Florida: Boca Ratón, 1994. p.109-120.