

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 26/04/2026.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP, CAMPUS DE
BOTUCATU**

Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Setor de Microbiologia e Imunologia.

Instituto de Biociências de Botucatu

**Mapeando a diversidade genética do complexo *Pythium*
*insidiosum***

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada,

BGA, IBB/Unesp

Doutoranda: Ana Carolina do Prado

Orientadora: Prof^ª Dra. Jessica Luana Chechi

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP, CAMPUS DE
BOTUCATU**

Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Setor de Microbiologia e Imunologia.

Instituto de Biociências de Botucatu

**Mapeando a diversidade genética do complexo *Pythium
insidiosum***

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada,

BGA, IBB/Unesp

Ana Carolina do Prado

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada na Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos. Sob orientação da Profa. Dra. Jéssica Luana Chechi

Botucatu – 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Prado, Ana Carolina do.

Mapeando a diversidade genética do complexo *Pythium insidiosum* / Ana Carolina do Prado. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Jéssica Luana Chechi

Capes: 20100000

1. Análise do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados. 2. Simulação por Computador. 3. Filogenia. 4. Genômica. 5. Pitiose.

Palavras-chave: AFLP; Estudos *in silico*; Filogenia; Genômica; Pitiose.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ANA CAROLINA DO PRADO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 26 dias do mês de abril do ano de 2024, às 09:00 horas, no(a) Instituto de Biociências de Botucatu / Híbrido, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ANA CAROLINA DO PRADO, intitulada **Mapeando a Diversidade Genética do Complexo *Pythium insidiosum***. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. JÉSSICA LUANA CHECHI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Microbiologia (ICB-II/USP) / Universidade de São Paulo - USP, Profa. Dra. LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES (Participação Virtual) do(a) Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) / Instituto Adolfo Lutz - IAL, Dr. HANS GARCIA GARCES (Participação Presencial) do(a) Diagnóstico Molecular / BGI Genomics, Profa. Dra. ISABELLA DE OLIVEIRA BARROS (Participação Virtual) do(a) Centro de Ciências Agrárias/ Departamento de Ciências Veterinária / Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Profa. Dra. DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Microbiologia e Parasitologia / Universidade Federal de Pelotas - UFPel. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: **APROVADA** . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. JÉSSICA LUANA CHECHI

**“Eu sou aquela mulher que fez a
escalada da montanha da vida,
removendo pedras e plantando
flores.”**

Cora Coralina

Agradecimentos

Introduzo meus agradecimentos com o coração transbordando de gratidão pela finalização, não só de um doutorado, mas a finalização de um ciclo. Um ciclo que não consigo descrever numa página, mas que renderia um bom livro, quem sabe um dia ainda terei o prazer de escrevê-lo. Finalizo um ciclo de crescimento e amadurecimento que vai muito além do profissional. Nesses últimos anos tive um grande desenvolvimento pessoal e este trabalho foi apenas um dos muitos desafios que contribuiu para este amadurecimento.

Finalizo este trabalho muito diferente de como o iniciei, com pessoas que permaneceram desde a idealização deste projeto. Não vou citar nomes, pois serei quereí ingrata com alguns. Agradeço aos meus amigos que acompanharam cada fase minha e ofereceram abrigo. Agradeço a equipe que esteve neste período no Laboratório de Micologia Médica e de Biologia de fungos do Instituto de Biociências de Botucatu, que foi minha segunda casa nos últimos seis anos. Agradeço aos parceiros que tive o privilégio de trabalhar neste projeto, a equipe do Departamento de Patologia e do Centro de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Mahidol em Bangkok, Tailândia. A equipe do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) no Rio Grande do Sul. A equipe do Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Agradeço, principalmente, minha família que nunca deixou de me apoiar em todas as fases.

Agradeço em especial, a professora, Dr.^a Jéssica, minha atual orientadora, que me acolheu num momento crítico e, com toda sua competência e profissionalismo, garantiu a finalização deste trabalho de forma leve.

E por fim, e mais importante, agradeço a Deus, por, neste período, ter me trazidos situações que me guiaram ao caminho de transformação interior e expansão de consciência ao qual me encontro, que me permite o autodesenvolvimento constante com muita clareza e cada vez mais sabedoria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.482449/2020-00.

Sumário

Mapeando a diversidade genética do complexo <i>Pythium insidiosum</i>	1
Mapeando a diversidade genética do complexo <i>Pythium insidiosum</i>	2
Resumo.....	7
Abstract	8
Introdução Geral.....	12
Justificativa	17
Objetivo Geral.....	17
Organograma do estudo	18
Atividades Extracurriculares realizadas	20
CAPÍTULO I.....	28
Inferências evolutivas para o Complexo <i>Pythium insidiosum</i> : filogenia multigênica.....	28
Resumo.....	28
Introdução	29
Métodos.....	32
Obtenção e isolamento a partir do material clínico.....	32
Processamento laboratorial dos “kunkers” e identificação molecular.....	32
Cultivo microbiológico	32
Nested-PCR.....	33
Condições de cultura e extração de DNA	33
Desenho de <i>primers</i> e reação em cadeia da polimerase (PCR).....	34
Sequenciamento e análise filogenética.....	35
Análises Filogenéticas.....	35
<i>Máxima Verossimilhança</i>	35
<i>Análise Bayesiana</i>	36
<i>Análise de Máxima Parcimônia</i>	36
Resultados	37
Análises Filogenéticas.....	38
<i>Máxima Verossimilhança</i> para genes individuais (Figura 2).....	38
Análise Bayesiana (Figura 4)	43
Discussão.....	49
Perspectivas das análises <i>unilocus</i>	49
Perspectiva da análise <i>Multilocus</i>	51
Conclusão.....	53

Referências Bibliográficas	53
CAPÍTULO II	60
Novos marcadores AFLP para explorar variações genômicas em <i>Pythium insidiosum</i> e <i>Pythium periculosum</i>	60
Resumo.....	60
Introdução	61
Metodologia	65
<i>AFLP in silico</i>	65
Análises <i>in vitro</i>	66
Processamento e identificação molecular de novas amostras.....	66
Cultivo microbiológico e extração de DNA genômico para análises <i>AFLP in vitro</i>	67
<i>AFLP in vitro</i>	67
Análise de dimensionamento (PCA).....	68
Arvore filogenética para comparação de topologia.....	69
Resultados e Discussão	70
AFLP in silico	70
Genotipagem	71
Análise Filogenética COX II.....	74
Conclusão Prévia.....	77
Referências Bibliográficas	77

Resumo

Pythium insidiosum é agente etiológico da pitiose, uma doença com prevalência em regiões de climas tropical e subtropical que acomete diferentes espécies animais, inclusive humanos. Estudos filogenéticos têm mostrado divergências intraespecíficas, primeiramente ao evidenciar que a espécie era dividida em três clados monofiléticos de acordo com diferentes regiões geográficas e, recentemente, por um dos clados ter sido classificado como uma nova espécie, *Pythium periculosum*. No entanto, essas informações foram baseadas em análises filogenéticas empregando-se de poucos genes isolados. Além disso, as relações entre os clados, bem como a inclusão de cepas brasileiras na caracterização a nível genômico em *P. insidiosum* são limitadas. Dessa forma, visamos traçar a relação genética de isolados de *Pythium insidiosum* de diferentes regiões do globo, por meio de inferências filogenéticas e de caracterização genotípica. No primeiro capítulo exploramos as inferências filogenéticas utilizando regiões gênicas codificantes da α e β -tubulina, do fator de alongamento da tradução (Tef-1 α), da subunidade II do citocromo oxidase (COX II) e a região do rDNA, o espaçador interno transcrito (ITS) 5.8S. Foram utilizadas matrizes contendo 55 taxons, de isolados de diversos países e dois grupos externos. As matrizes foram submetidas às inferências Máxima Verossimilhança, Baysena e Máxima Parcimônia. Para as análises genotípicas submetemos genomas representantes dos três clados intraespecífico (n=12), disponíveis na base de dados *GenBank* à técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) *in silico*. Nossos resultados filogenéticos mostram que, para todos os genes avaliados, houve maior proximidade evolutiva do clado I e II, e que esses se distanciam acentuadamente do clado III. Os genes da α e β -tubulina e COXII demonstram diversidade genética dentro de cada clado sendo interessante para estudos evolutivos. Já Tef-1 α separa os isolados em dois clados, sendo um dos clados politômicos (clado I e II) e outro contendo cepas do clado III, considerada atualmente uma nova espécie e, dessa forma, esse gene pode ser usado na diferenciação entre *P. insidiosum* e *P. periculosum*. A genotipagem explicita a proximidade entre os clado I e II, no entanto mostra cepas incluídas anteriormente no clado I alocadas ao clado III, considerada nova espécie críptica, esses resultados são corroborados na análise filogenética, explicitando a necessidade de validação contínua das técnicas de genotipagem com os antigos e novos isolados em comparação com análises evolutivas propriamente dita, para melhor entendimento da epidemiologia e disseminação da espécie a nível mundial.

Palavras-chave: Genômica, Filogenia, pitiose, AFLP, estudos *in silico*, genotipagem.

Abstract

Pythium insidiosum is the etiologic agent of pythiosis, a disease prevalent in tropical and subtropical climates that affects different animal species, including humans. Phylogenetic studies have shown intraspecific divergences, first by showing that the species was divided into three monophyletic clades according to different geographical regions and, recently, by one of the clades being classified as a new species, *Pythium periculosum*. However, this information was based on phylogenetic analyses using a few isolated genes. In addition, the relationships between the clades, as well as the inclusion of Brazilian strains in the characterization at genomic level in *P. insidiosum* are limited. Thus, we aim to trace the genomic relationship of *P. insidiosum* isolates from different regions of the world, through phylogenetic inferences and genotypic characterization. In the first chapter we explored phylogenetic inferences using gene regions coding for α - and β -tubulin, translation elongation factor (Tef-1 α), cytochrome oxidase subunit II (COX II) and the 5.8S internal transcribed spacer (ITS) region. Matrices containing 55 taxons from isolates from different countries and two external groups were used. The matrices were subjected to Maximum Likelihood, Baysena and Maximum Parsimony inference. For the genotypic analyses, we submitted genomes representing the three intraspecific clades (n=12), available in the GenBank database, to the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) technique in silico. Our phylogenetic results show that, for all the genes evaluated, there was greater evolutionary proximity between clades I and II, and that these are markedly different from clade III. The α - and β -tubulin and COXII genes show genetic diversity within each clade, which is interesting for evolutionary studies. Tef-1 α , on the other hand, separates the isolates into two clades, one of which is polytomous (clades I and II) and the other containing strains from clade III, which is currently considered to be a new species, and, in this way, this gene can be used to differentiate between *P. insidiosum* and *P. periculosum*. Genotyping shows the proximity between clades I and II, however, it shows strains previously typed in clade I allocated to clade III, considered a new cryptic species. These results are confirmed in the phylogenetic analysis, explaining the need for continuous validation of genotyping techniques with old and new isolates in comparison with evolutionary analysis itself, to better understand the epidemiology and spread of the species worldwide.

Keywords: Genomics, phylogeny, pythiosis, AFLP, in silico studies, genotyping.

Potencial impacto Social e Econômico

Pesquisas com *Pythium insidiosum*, um microrganismo aquático que causa a doença chamada Pitiose, têm impactos econômicos e sociais significativos no Brasil e em todo o mundo.

1. Impacto Econômico:

a. Custos de Saúde: A pitiose é uma doença cujo prognóstico é extremamente reservado em animais, principalmente em cavalos. Diagnósticos diferenciais devem ser feitos na pitiose equina, porém nem sempre é viável ao Médico Veterinário a campo. Por consequência, a demora no diagnóstico acarreta prejuízos financeiros para os proprietários dos animais afetados e, além disso, pode levar os animais ao óbito.

b. Perda de Produtividade Animal: a progressão da pitiose pode causar perda de produtividade nos animais afetados, destacando-se as espécies animais de produção, como bovinos, caprinos e ovinos. Os cavalos são importantes animais de trabalho em áreas de pecuária de corte, sendo imprescindíveis na remoção de bovinos das áreas alagadas para as áreas de terra firme na região do Pantanal brasileiro, uma importante região de criação de gado de corte no Brasil.

c. Custos de Pesquisa: Os recursos necessários para conduzir pesquisas sobre a doença, incluindo estudos epidemiológicos, desenvolvimento de métodos de diagnósticos rápidos, vacinas e terapias, também representam um impacto econômico significativo, no entanto, a falta deste investimento impacta de forma muito significativa os dois pontos anteriores.

2. Impacto Social:

a. Bem-estar Animal: A pitiose pode causar sofrimento significativo nos animais afetados, comprometendo o bem-estar animal e o emocional dos proprietários. Além dos animais de produção, a doença também é observada em cães e gatos e o óbito desses animais impacta fortemente no emocional dos seus tutores.

b. Segurança Alimentar: Os bovinos normalmente desenvolvem lesões na extremidade dos membros, o que afeta a locomoção desses animais. E, afetando a porção superior dos membros pode haver destruição significativa da musculatura, o que causaria impacto negativo na produção de carne. O mesmo pode ser observado nos pequenos ruminantes.

c. Impacto na Comunidade: como já mencionado, a doença pode afetar os animais onde a pecuária é uma atividade central da cultura e economia, gerando preocupações sociais e econômicas adicionais.

Globalmente, a pesquisa sobre *Pythium insidiosum* também pode acarretar implicações para a saúde pública, uma vez que a pitiose ocorre também em humanos e os profissionais de saúde não estão familiarizados com este patógeno e a doença para se fazer um correto diagnóstico. Portanto, compreender melhor os aspectos etiológicos do agente, a epidemiologia da doença, desenvolver medidas preventivas, aprimorar as formas de diagnóstico para que sejam mais precisos e específicos, bem como o tratamento eficaz, implicam diretamente para a saúde pública em várias regiões do mundo.

No Brasil, um dos países com maior endemia da pitiose equina, e, especificamente, onde a pecuária é uma atividade significativa da economia e a população de cavalos é considerável, os impactos econômicos e sociais das pesquisas com *Pythium*

insidiosum são particularmente relevantes. A pesquisa nesta área pode ajudar a mitigar os custos associados à doença, melhorar o bem-estar animal e a segurança alimentar. Especificamente, pesquisa com envolvimento de dados genômicos, contribui no desenvolvimento de métodos diagnóstico molecular rápido, que reflete diretamente no prognóstico da doença, além de contribuir para compreensão da epidemiologia do agente.

Potential social and economic impact of this project

Research into *Pythium insidiosum*, an aquatic microorganism that causes the disease called *Pythiosis*, has significant economic and social impacts in Brazil and around the world.

1. Economic Impact:

a. Health Costs: Pythiosis is a disease whose prognosis is extremely poor in animals, especially horses. Differential diagnoses must be made in equine pythiosis, but this is not always feasible for the veterinary surgeon in the field. As a result, delays in diagnosis result in financial losses for the owners of affected animals and can also lead to death.

b. Loss of Animal Productivity: the progression of pythiosis can cause loss of productivity in affected animals, particularly production animals such as cattle, goats, and sheep. Horses are important working animals in beef cattle ranching areas and are indispensable in moving cattle from flooded areas to dry land areas in the Brazilian Pantanal region, an important beef cattle ranching region in Brazil.

c. Research Costs: The resources needed to conduct research into the disease, including epidemiological studies, the development of rapid diagnostic methods, vaccines and therapies, also represent a significant economic impact, however, the lack of this investment has a very significant impact on the previous two points.

2. Social Impact:

a. Animal Welfare: Pythiosis can cause significant suffering in affected animals, jeopardising animal welfare and the emotional well-being of owners. In addition to production animals, the disease is also seen in dogs and cats and the death of these animals has a strong impact on the emotional state of their owners.

b. Food safety: Cattle usually develop lesions at the end of their limbs, which affects their locomotion. And if the upper portion of the limbs is affected, there can be significant destruction of the musculature, which would have a negative impact on meat production. The same can be observed in small ruminants.

c. Impact on the Community: as already mentioned, the disease can affect animals where livestock farming is a central activity of the culture and economy, generating additional social and economic concerns.

Globally, research into *Pythium insidiosum* may also have implications for public health, since pythiosis also occurs in humans and health professionals are not familiar enough with this pathogen and the disease to make a correct diagnosis. Therefore, better

understanding the etiological aspects of the agent, the epidemiology of the disease, developing preventive measures, improving the forms of diagnosis so that they are more precise and specific, as well as more effective treatment, have direct implications for public health in various regions of the world.

In Brazil, one of the countries with the greatest endemicity of the disease, and specifically where livestock farming is a significant economic activity and the horse population is considerable, the economic and social impacts of research into *Pythium insidiosum* are particularly relevant. Research in this area can help mitigate the costs associated with the disease, improve animal welfare and food safety. Specifically, research involving genomic data contributes to the development of rapid molecular diagnostic methods, which directly reflects on the prognosis of the disease, as well as contributing to understanding the epidemiology of the agent.

Introdução Geral

Pitiose é uma infecção crônica granulomatosa causada pelo agente infeccioso, *Pythium insidiosum* considerado anteriormente como um fungo pertencente ao Reino Fungi, porém reclassificado no Reino Stramenopila, Classe Oomycota, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae (DE COCK et al., 1987). As lesões por este micro-organismo comprometem principalmente o tecido subcutâneo de mamíferos, incluindo os humanos (LEAL et al., 2001).

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático no qual seu ciclo de vida envolve a colonização do tecido vegetal com o desenvolvimento das hifas e em suas extremidades ocorre a formação de zoosporângios onde se desenvolvem os zoósporos biflagelados, oriundos da reprodução assexuada, que após a maturação são liberados no meio aquático em busca de um novo tecido vegetal onde reiniciará seu ciclo. A infecção e o desenvolvimento da doença ocorrem quando estes zoósporos livres no ambiente penetram no tecido animal (MENDOZA et al., 1996). O gênero *Pythium* caracteriza-se por englobar micro-organismos fitopatogênicos, sendo que a espécie *P. insidiosum* é o agente etiológico da doença em animais, no entanto, recentemente foi destacada de dentro desta espécie o clado III, agora denominada *Pythium periculosum* (BARBOSA et al., 2023; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SOUTO et al., 2021). Além disso, dois casos de pitiose humana foram reportados por outra espécie, *P. aphanidermatum*, o que reforça a necessidade de mais estudos também com esta espécie (CALVANO et al., 2011).

A pitiose é comum em regiões tropicais e subtropicais, no entanto casos importados em humanos têm sido registrados em zonas temperadas após passagem dos pacientes por áreas endêmicas de pitiose nos trópicos (GAASTRA et al., 2010a; MENDOZA; ALFARO, 1986; MOSBAH et al., 2012). O Brasil é considerado um país endêmico desta doença, com a maioria dos casos em equinos, sendo a doença reportada em todas as regiões, onde os casos são relatados com maior frequência em períodos de elevada pluviosidade, fato este relacionado ao ciclo de vida da espécie (Figura 1) (BARBOSA et al., 2023; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SOUTO et al., 2021).

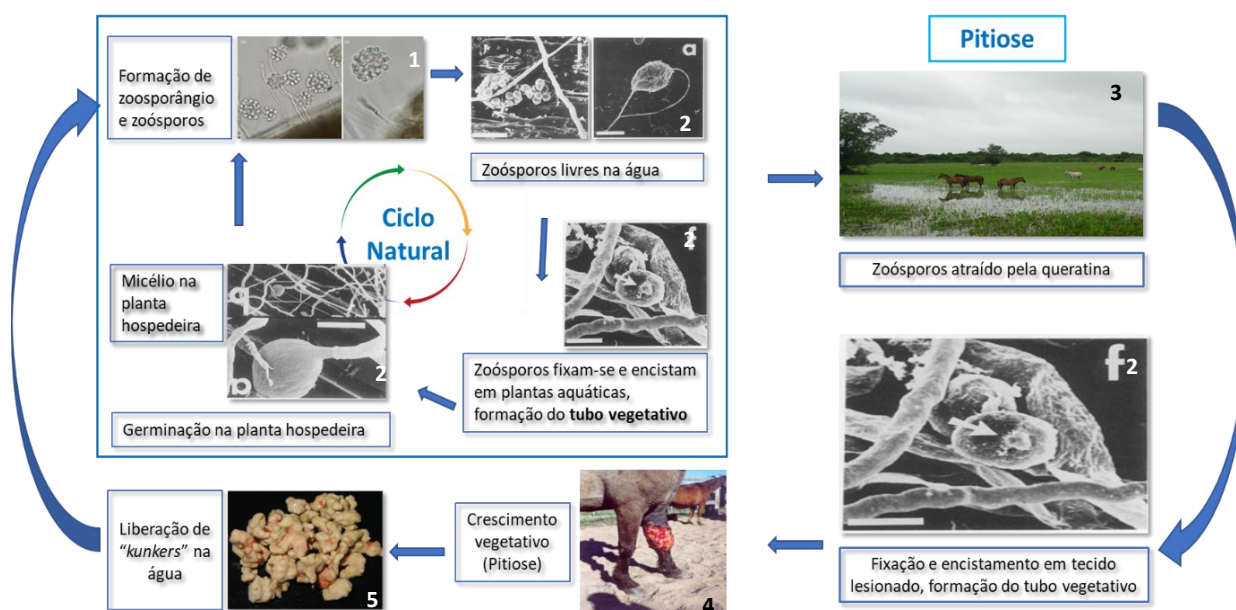


Figura 1. Ilustração do ciclo de vida de *P. insidiosum* e a ocorrência da infecção. Imagens provenientes de: 1. GAASTRA et al., 2010; 2. MENDOZA et al., 1996; 3. REVISTA VETERINÁRIA, 2017; 4. SANTURIO, 2004; 5. CARDONA et al., 2013.

Dentre as principais espécies acometidas, observam-se, principalmente os equinos (MEIRELES et al., 1993), os cães (FISCHER et al., 1994) e a espécie humana (IMWIDTHAYA, 1994; KEOPRASOM et al., 2013; KRAJAEJUN et al., 2006, BOSCO et al., 2005), no entanto já foi relatado em felinos (RAKICH et al., 2002), bovinos (PÉREZ et al., 2005; GRECCO et al., 2009), ovinos (SANTURIO et al., 2008; TABOSA et al., 2004), caprinos (DO CARMO et al., 2015), asininos (ÁLVAREZ CARDONA et al., 2013) em animais silvestres em cativeiro (BUERGELT et al., 2006; CAMUS et al., 2004) e também em uma ave silvestre dos Estados Unidos (PESAVENTO et al., 2018) e um avestruz no Brasil (SOUTO et al., 2020).

O primeiro caso de pitiose humana por *Pythium insidiosum*, foi relatado na Tailândia em 1985 (THIANPRASIT et al., 1986). Entretanto os casos de pitiose são descritos atualmente no mundo todo, principalmente em épocas de maiores índices pluviométricos, acometendo animais e humanos (SHENEP et al., 1998; PÉREZ et al., 2004; PFALLER & DIEKEMA, 2007; KRAJAEJUN et al., 2006; THANATHANEE et al., 2013). A principal forma de infecção ocorre por meio da penetração de zoósporos biflagelados, que após a sua formação permanecem livres no ambiente aquático e apresentam quimiotaxia aos pelos dos mamíferos, podendo também aderir ao tecido através do folículo piloso ou por uma ferida exposta. Ao se fixarem no hospedeiro formam

tubo germinativo, que corresponde ao início da formação das hifas, formas parasitárias nos tecidos animais (MENDOZA et al., 1993).

Os humanos são a segunda espécie de maior ocorrência da pitiose, após a espécie equina, com grande número de casos na Índia (434), Tailândia (293), nos EUA (14), China (14), Austrália (3), dois casos em Israel e Espanha, e casos únicos nos países Brasil, Costa Rica, Japão, México, Malásia, Jamaica, Haiti e Nova Zelândia (YOLANDA and KRAJAEJUN, 2022). O primeiro, e único até o momento, relato de caso de pitiose humana no Brasil foi descrito no estado de São Paulo, cuja fonte de infecção foi decorrente da atividade de pescaria. O diagnóstico conclusivo só foi estabelecido após sequenciamento da região ITS-5.8S do DNA ribossomal, evidenciando a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico, pois a princípio este paciente foi tratado para zigomicose (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006).

A doença tem se manifestado por lesões granulomatosas dos tecidos cutâneos e subcutâneos principalmente em equinos e humanos (CHAFFIN et al., 1995; GAASTRA et al., 2010), por comprometimento gastrointestinal em equinos e cães (MILLER, 1985; FISCHER et al., 1994), ceratite em humanos (TANHEHCO et al., 2011; RATHI et al., 2018) e também pela forma disseminada, caracterizada por infecção sistêmica com a formação de gangrena ou aneurisma em humanos (IMWIDTHAYA et al., 1994).

Os equinos são os animais mais acometidos pela pitiose e as regiões anatômicas mais afetadas pela doença compreendem as regiões inferiores, como as extremidades distais dos membros, região ventral torácica e abdominal, fato explicado por serem as partes que estão em maior contato com a água (MENDOZA et al., 1996). Nas lesões dos tecidos cutâneo/subcutâneo em equinos são observados pequenos granulomas com morfologia irregular, muitas vezes assemelhando-se ao trajeto das hifas, de coloração bege-amarelada que são denominados “*kunkers*”, os quais correspondem a uma reação imunológica muito intensa desencadeada pela degranulação de eosinófilos e mastócitos ao redor das hifas (MENDOZA & NEWTON, 2005). A pitiose intestinal é a segunda forma de infecção mais comum, entretanto detalhes da forma de contaminação são pouco conhecidos, sendo a ingestão de água com zoósporo considerada a principal forma de infecção (MENDOZA et al., 1993; BEZERRA JÚNIOR et al., 2010; GAASTRA et al., 2010).

O diagnóstico e o tratamento da pitiose têm sido baseados no histórico clínico do animal/paciente, os métodos de identificação de *P. insidiosum* consomem tempo, agravando o prognóstico da doença (CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013; INTARAMAT et al., 2016; INKOMLUE et al., 2016). Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose consiste em exames histopatológico, por vezes difícil por suas hifas serem semelhantes e confundidas com fungos zigomicetos; isolamento do agente em cultura (MENDOZA et al., 1996; GROOTERS et al., 2002), testes sorológicos (KRAJAEJUN et al., 2009; JINDAYOK et al., 2009; KEERATIJARUT et al., 2013; KRAJAEJUN et al., 2002), e ensaios moleculares (KEERATIJARUT et al., 2014; BADENOCH et al., 2001; BOTTON et al., 2011) . O tratamento baseado em antifúngicos tradicionais é difícil, já que a maioria desses atuam na molécula do ergosterol presente na membrana celular dos fungos verdadeiros e ausente em *P. insidiosum* (SEKHON et al., 1992; GROOTERS, 2003; MENDOZA & NEWTON, 2005). Na maioria dos casos o tratamento de escolha é o desbridamento cirúrgico da lesão, respeitando-se margens de borda e profundidade, ou mesmo, a amputação do membro afetado dependendo do estágio da infecção. Dessa forma, o diagnóstico precoce melhora o prognóstico (IMWIDTHAYA, 1994; SHENEP et al., 1998; KRAJAEJUN et al., 2006).

Abordagens de genética molecular têm contribuído para desvendar características genômicas de muitas espécies, especialmente nos oomicetos pelas suas peculiaridades, incluindo *P. insidiosum*. Estudos filogenéticos mostravam isolados da espécie do mundo todo subdivididos em três clados distintos (Clado I, II e III ou A, B e C), sendo o clado I composto apenas por cepas americanas, e o clado II por isolados da Índia, Austrália e Tailândia e III composto por cepas tailandesas e dos EUA (SCHURKO et al., 2003a, 2003b; AZEVEDO et al., 2012; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; RIBEIRO et al., 2017). Os isolados do Brasil, EUA e Costa Rica, apresentam mesmo perfil filogenético.

No Brasil, os casos de pitiose, majoritariamente em equinos, são amplamente descritos na regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, isolados esses que não apresentaram divergência filogenética baseada na região ribossomal do ITS, do gene Cox II e β -glucanase (SCHURKO et al., 2003a, 2003b; AZEVEDO et al., 2012; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011, RIBEIRO et al., 2017). Recentemente nosso grupo publicou o primeiro surto de pitiose equina em cinco cavalos, ocorrido na região Sudeste do Brasil, interior de São Paulo (PAZ et al., 2021). Estudos atuais mostram a

existência de casos de pitiose na região Norte e Nordeste do Brasil (BARBOSA et al., 2023; SOUTO et al., 2021), no entanto o diagnóstico molecular é limitado nessas regiões bem como a investigação do perfil filogenético da espécie nessa localidade é inexistente. Assim sendo, de forma geral há subnotificação da pitiose nessas regiões, além da falta de informação sobre a distribuição e filogenia da espécie em outras áreas do país.

Além das abordagens filogenética, a AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é uma técnica de tipagem molecular que tem contribuído para a caracterização genética e estudos epidemiológicos de diversos patógenos. Esta técnica se destaca pela sua rapidez de obtenção de dados alinhados ao baixo custo e simplicidade, tornando a acessibilidade da técnica bastante alta. Mostrou-se eficaz na caracterização do gênero *Pythium* spp. (BOGALE et al., 2006; BORST et al., 2003; DURÁN et al., 2010; GARZÓN et al., 2005; GRIL et al., 2010; HERKERT et al., 2016; KAVITHA et al., 2007; NAJAFZADEH et al., 2010; WARRIS et al., 2003).

A importância da análise AFLP deriva de sua capacidade de gerar um grande número de fragmentos marcadores para qualquer espécie, sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência genômica e tem sido amplamente utilizada na microbiologia empregada para uma variedade de aplicações, como avaliar a diversidade genética intraespecífica ou entre espécies intimamente relacionadas, inferir padrões biogeográficos em nível populacional, gerar mapas genéticos e determinar parentesco entre cultivares (PAUN & SCHÖNSWETTER, 2012; SAVELKOUL et al., 1999). Na micologia vem sendo usada na genotipagem de várias espécies, recentemente foi usada para o mapeamento genômico a fim explorar variações intraespecífica do complexo *Sporothrix* spp. (DE CARVALHO et al., 2020; 2021). Inclusive já se mostrou eficaz na genotipagem de isolados de *Pythium insidiosum* evidenciando diversidade genética intraespecífica na Flórida (PRESSER & GOSS, 2015).

Os trabalhos utilizando abordagens de genoma completo se restringem a uma das regiões endêmicas no mundo, a Tailândia, país em que estudos sugerem ter maior diversidade da espécie (SCHURKO et al., 2003a; 2003b; VILLA et al., 2006; AZEVEDO et al., 2012; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; KRAJAEJUN et al., 2014; RUJIRAWAT et al., 2017, 2018a).

Entretanto sabemos que o Brasil, mesmo com uma subnotificação gigantesca, apresenta uma das regiões de maior incidência e prevalência da pitiose equina no mundo

(YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022), onde a maioria dos casos são descritos na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste, com inexistência de investigação epidemiológica e com estudos moleculares para espécie no Norte e Nordeste do Brasil. Dessa forma podemos observar que os estudos epidemiológicos e investigações moleculares dentro de um dos países com maior endemia de pitiose equina no mundo é extremamente escasso, o que repercute na limitação do conhecimento em relação ao perfil genético e distribuição da espécie, além de retardar o diagnóstico da pitiose e comprometer o prognóstico das espécies afetadas.

Conclusão

Pelo perfil genotípico, *in silico*, foi possível determinar marcadores que demonstrem variação intraespecífica baseada em dados genômicos totais, apesar de estarem ainda sendo validados para os três clados pelos experimentos *in vitro* (em andamento), pelos resultados apresentados é possível, pela primeira vez, observar diversidade de *P. insidiosum* dentre as regiões brasileiras.

Pela comparação das análises *in silico* com a filogenia traçada, onde temos uma representação total da amostragem deste trabalho, podemos identificar a necessidade de validação das técnicas de genotipagem já validadas para identificação dos clados, traçando análises comparativas com dados filogenéticos por diferentes inferências evolutivas para *P. insidiosum*, visto a grande diversificação genética intraespecífica e o desdobramento atual em nova espécie críptica.

Referências Bibliográficas

ÁLVAREZ CARDONA, J.; VILORIA VARGAS, I.; AYOLA PERDOMO, C. Evaluación clínica e histopatológica de la pitiosis cutánea en burros (*Equus asinus*). **Rev. Med. Veterinaria**, v. 25, p. 9–20, 2013.

APPAVU, S. P.; PRAJNA, L.; RAJAPANDIAN, S. G. K. Genotyping and phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* causing human corneal ulcer. **Medical Mycology**, v. 58, n. 2, p. 211–218, 1 fev. 2020.

- 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.
- BABICKI, S. et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W147–W153, 8 jul. 2016.
- BARBOSA, J. D. et al. Cutaneous pythiosis in equines in the Amazon Biome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 43, p. e07167, 28 abr. 2023.
- BEAKES, G. W. Oomycete fungi: their phylogeny and relationship to chromophyte algae. Em: **The chromophyte algae: problems and perspectives**. [s.l.] Clarendon Press Oxford, 1989. p. 325–342.
- BEAKES, G. W.; GLOCKLING, S. L.; SEKIMOTO, S. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 3–19, 1 jan. 2012.
- BEAKES G.W, B. G. W. Oomycete phylogeny: ultrastructural perspectives. **In Evolutionary biology of the fungi.**, 1987.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314–331, maio 1980.
- BRANDON MATHENY, P. et al. Contributions of rpb2 and tef1 to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, n. 2, p. 430–451, 2007.
- BUERGELTD, C. et al. ABDOMINAL PYTHIOSIS IN A BENGAL TIGER (PANTHERA TIGRIS TIGRIS). v. 37, n. 2, p. 186–189, [s.d.].
- CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3710–3713, 2011.
- CAMPBELL, C. K. Pythiosis. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 4, p. 227–228, jul. 1990.
- CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar , *Panthera onca*. p. 567–571, 2004.
- CARVALHO, J. A. DE et al. Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic *Sporothrix* species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008330, 1 jul. 2020.
- CASTELLANO, M. A.; ELLIOTT, T. F.; TRAPPE, J. M. Fungal Systematics and Evolution **VOLUME**. v. 1, n. June, p. 13–22, 2018.
- CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W. C. Cutaneous pythiosis in the horse. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 11, n. 1, p. 91–103, abr. 1995.
- CHECHI, J. L. et al. Prospecting Biomarkers for Diagnostic and Therapeutic Approaches in Pythiosis. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 423, jun. 2021.
- CHITASOMBAT, M. N. et al. Recent update in diagnosis and treatment of human pythiosis. **PeerJ**, v. 8, p. e8555, 2020.
- CUSTOM PRIMERS | IDT. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/custom-primers>>. Acesso em: 2 abr. 2024.
- DE CARVALHO, J. A. et al. Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging *Sporothrix* species. **Studies in Mycology**, v. 100, p. 100129, 1 set. 2021.
- DE COCK, A. W. A. M. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 344–349, 1987.

- DE LR; JONES. Resting Spores of the Potato Fungus (*Phytophthora infestans*). **Science**, v. 30, n. 779, p. 813–814, 3 dez. 1909.
- DE MORAES GIMENES BOSCO, S. et al. Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 557–565, jan. 2008.
- DE VIENNE, D. M.; GIRAUD, T.; MARTIN, O. C. A congruence index for testing topological similarity between trees. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 23, p. 3119–3124, 1 dez. 2007.
- DO CARMO, P. M. S. et al. Cutaneous pythiosis in a goat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 152, n. 2–3, p. 103–105, 2015.
- EINAX, E.; VOIGT, K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum fungi. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 185–194, 2003.
- FISCHER, J. R. et al. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs : eleven cases. v. 382, p. 380–382, 1994.
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1–2, p. 1–16, 2010.
- GRECCO, F. B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul 1. v. 29, n. 11, p. 938–942, 2009.
- GROOTERS, A. M. Pythiosis , lagenidiosis , and zygomycosis in small animals. v. 33, p. 695–720, 2003.
- GURNANI, B. et al. Retrospective multifactorial analysis of *Pythium* keratitis and review of literature. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 5, p. 1095–1101, maio 2021.
- GURNANI, B. et al. *Pythium insidiosum* keratitis - A review. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 70, n. 4, p. 1107, abr. 2022.
- HTUN, Z. M. et al. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Identification of *Pythium insidiosum*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 149–159, 1 dez. 2020.
- IMWIDHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**, v. 70, n. 826, p. 558–560, 1994.
- JACCARD, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist*, 11(2), 37-50.
- JINDAYOK, T. et al. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 16, n. 7, p. 1047–1051, jul. 2009.
- KAMMARNJESADAKUL, P. et al. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). **Medical mycology**, v. 49, n. 3, p. 289–295, 2011a.
- KEELING, P. J. Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 3, p. 298–309, 2003.
- KEERATIJARUT, A. et al. A peptide ELISA to detect antibodies against *Pythium insidiosum* based on predicted antigenic determinants of exo-1,3-beta-glucanase. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 44, p. 672–80, 4 jul. 2013.
- KEERATIJARUT, A. et al. PCR amplification of a putative gene for exo-1,3- β -glucanase to identify the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Asian Biomedicine**, v. 8, n. 5, p. 637–644, 30 set. 2014.

- KEERATIJARUT, A. et al. Detection of the oomycete *Pythium insidiosum* by real-time PCR targeting the gene coding for exo-1,3- β -glucanase. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 971–977, 1 set. 2015.
- KEOPRASOM, N. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient presenting as bilateral leg ulcers. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, n. 1, p. 25–28, 2013.
- KITTICHOTIRAT, W. et al. Draft genome and sequence variant data of the oomycete *Pythium insidiosum* strain Pi45 from the phylogenetically-distinct Clade-III. **Data in Brief**, v. 15, p. 896–900, dez. 2017.
- KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and Epidemiological Analyses of Human Pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 569–576, 2006.
- KRAJAEJUN, T. et al. Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 7, p. 683–696, 1 jul. 2011.
- KRAJAEJUN, T. et al. Transcriptome analysis reveals pathogenicity and evolutionary history of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Fungal Biology**, v. 118, n. 7, p. 640–653, 2014.
- KRAJAEJUN, T. et al. Assessment of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification and biotyping of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 77, p. 61–67, 1 dez. 2018a.
- KRAJAEJUN, T. et al. Data on whole genome sequencing of the oomycete *Pythium insidiosum* strain CBS 101555 from a horse with pythiosis in Brazil. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 880, 11 dez. 2018b.
- KRAJAEJUN, T. et al. Draft genome sequence of the oomycete *Pythium destruens* strain ATCC 64221 from a horse with pythiosis in Australia. **BMC research notes**, v. 13, n. 1, p. 329, 9 jul. 2020.
- KRAJAEJUN, T. et al. Genome data of four *Pythium insidiosum* strains from the phylogenetically-distinct clades I, II, and III. **BMC Research Notes**, v. 14, p. 197, 21 maio 2021.
- KROON, L. P. N. M. et al. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 8, p. 766–782, 2004.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018.
- LEAL, A. T. et al. Pitiose. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 735–743, 2001.
- LI, M.; CHEN, M.; PAN, W. Approaches on genetic polymorphism of *Cryptococcus* species complex. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, v. 18, n. 4, p. 1227–1236, 1 jun. 2013.
- LIU, B. H. **Genômica Estatística: Análise de ligação, mapeamento e QTL**. [s.l.: s.n.].
- LOHNOO, T. et al. Efficiency Comparison of Three Methods for Extracting Genomic DNA of the Pathogenic Oomycete. v. 97, n. 3, p. 7, 2014.
- MANI, R. et al. Identification of *Pythium insidiosum* complex by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 574–584, 1 abr. 2019.
- MAR HTUN, Z. et al. Identification and Biotyping of *Pythium insidiosum* Isolated from Urban and Rural Areas of Thailand by Multiplex PCR, DNA Barcode, and Proteomic Analyses. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 242, abr. 2021.
- MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 865–868, set. 2012.

- MEIRELES, M. C. A. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil: Kutane Pythiose bei Pferden in Brasilien. **Mycoses**, v. 36, n. 3–4, p. 139–142, 1993.
- MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**, v. 94, n. 2, p. 123–129, 1986.
- MENDOZA, LEONEL; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Medicale**, Journal de Mycologie Medicale. v. v. 6, p. 151–164, 1996.
- MINOR, I. et al. FUNGUS IS LETHAL TO BOTH WESTERN DRYWOOD AND WESTERN (RETICULITERMES HESPERUS) TERMITES . 2016.
- MIRAGLIA, B. M. et al. *Pythium insidiosum* complex hides a cryptic novel species: *Pythium periculosum*. **Fungal Biology**, v. 126, n. 5, p. 366–374, 1 maio 2022.
- MIRHENDI, H. et al. Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 215–224, 1 abr. 2015.
- MOSBAH, E. et al. Diagnosis and Surgical Management of Pythiosis in Draft Horses: Report of 33 Cases in Egypt. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 3, p. 164–169, 2012.
- NEGRUTSKII, B. S.; EL'SKAYA, A. V. **Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 α : Structure, Expression, Functions, and Possible Role in Aminoacyl-tRNA Channeling**. [s.l.] Elsevier Masson SAS, 1998. v. 60
- PAKSHIR, K. et al. Translation elongation factor 1-alpha gene as a marker for diagnosing of candidal onychomycosis. **Current Medical Mycology**, v. 6, n. 1, p. 15–21, 2020.
- PAL, M.; MAHENDRA, R. Pythiosis: An emerging oomycetic disease of humans and animals. **International Journal of Livestock Research**, v. 4, n. 6, p. 1–9, 2014.
- PARIS, M. et al. Amplified fragment length homoplasmy: in silico analysis for model and non-model species. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 287, 7 maio 2010.
- PATUMCHAROENPOL, P. et al. Draft genome sequences of the oomycete *Pythium insidiosum* strain CBS 573.85 from a horse with pythiosis and strain CR02 from the environment. **Data in Brief**, v. 16, p. 47–50, 1 fev. 2018.
- PAUN, O.; SCHÖNSWETTER, P. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 862, p. 75–87, 2012.
- PAZ, G. S. DA et al. Outbreak of equine pythiosis in a southeastern region of Brazil: Environmental isolation and phylogeny. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. n/a, n. n/a, 15 maio 2021.
- PÉREZ, R. C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 121–128, 2005.
- PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; CHINDAMPORN, A. Human Pythiosis: Emergence of Fungal-Like Organism. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 801–812, out. 2020.
- POWELL, W. et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 3, p. 225–238, 1 set. 1996.
- PRESSER, J. W.; GOSS, E. M. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. **Medical Mycology**, v. 53, n. 7, p. 674–683, set. 2015.
- PREVOST, A.; WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 1, p. 107–112, 1 jan. 1999.

- RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. Gastrointestinal pythiosis in two cats. v. 7383, p. 146–148, 2002.
- RIBEIRO, T. C. et al. Microevolutionary analyses of *Pythium insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on exo-1,3- β -glucanase gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 58–63, 1 mar. 2017.
- RODRIGUES AM, Beale MA, Hagen F, Fisher MC, Della Terra PP, de Hoog S, et al. The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent years. *Stud Mycol*. 2020.
- RUJIRAWAT, T. et al. Draft genome sequence of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* strain Pi-S, isolated from a patient with pythiosis. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. 1–2, 2015.
- RUJIRAWAT, T. et al. Single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR for identification and genotyping of the oomycete *Pythium insidiosum* from humans, animals and the environment. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 54, p. 429–436, out. 2017a.
- RUJIRAWAT, T. et al. Single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR for identification and genotyping of the oomycete *Pythium insidiosum* from humans, animals and the environment. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 429–436, 1 out. 2017.
- RUJIRAWAT, T. et al. Probing the Phylogenomics and Putative Pathogenicity Genes of *Pythium insidiosum* by Oomycete Genome Analyses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
- SAMSON, R. A. et al. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. **Studies in Mycology**, v. 2004, n. 49, p. 175–200, 2004.
- SANTURIO, J. M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**, v. 163, n. 9, p. 276–277, 2008.
- SASAKI, A. A. et al. Chromosomal Polymorphism in the *Sporothrix schenckii* Complex. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86819, 23 jan. 2014.
- SAVELKOUL, P. H. M. et al. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3083–3091, out. 1999.
- 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, mar. 2003a.
- SCHURKO, A. M. et al. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycological research**, v. 107, n. 5, p. 537–544, 2003b.
- SOUTO, E. P. F. et al. Pythiosis in Equidae in Northeastern Brazil: 1985–2020. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 105, p. 103726, 1 out. 2021.
- SRIDAPAN, T.; KRAJAEJUN, T. Nucleic Acid-Based Detection of *Pythium insidiosum*: A Systematic Review. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 1, p. 27, 23 dez. 2022.
- TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in Northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 4, p. 412–415, 2004.
- TANG, A. M. C.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. Phylogenetic utility of protein (RPB2, β -tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequences in the systematics of Sordariomycetes (Ascomycota, Fungi). **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 327–349, 2007.
- TESSIER, C. et al. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 1, p. 171–177, 1 jan. 1999.

- THIANPRASIT, M.; CHAIPRASERT, A.; IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 7, n. 1, p. 43–54, dez. 1996.
- THINES, M. Oomycetes. **Current Biology**, v. 28, n. 15, p. R812–R813, 6 ago. 2018.
- THON, M. R.; ROYSE, D. J. Partial β -tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 468–474, 1999.
- VAN'T KLOOSTER, J. W. et al. *tef1*, a *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation factor 1 alpha. **Gene**, v. 249, p. 145–151, 2000.
- VARSHNEY, R. K. et al. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, v. 173, n. 6, p. 638–649, 1 dez. 2007.
- VAUTERIN L, Vauterin P. Integrated databasing and analysis. In: Stackebrandt E, editor. *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; p. 141–217, 2006.
- VILLA, N. O. et al. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 410–422, 2006.
- VISHWAKARMA, P.; BAGGA, B. *Pythium insidiosum* keratitis: Review of literature of 5 years' clinical experience at a tertiary eye care center. **Seminars in Ophthalmology**, v. 38, n. 2, p. 190–200, fev. 2023.
- VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407–4414, 11 nov. 1995.
- WEIBLEN, C. et al. New insights on evolutionary aspects of *Pythium insidiosum* and other peronosporaleans. **Mycoses**, v. 63, n. 4, p. 395–406, 2020.
- YOLANDA, H.; KRAJAEJUN, T. Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against *Pythium insidiosum*. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. e03737, abr. 2020.
- YOLANDA, H.; KRAJAEJUN, T. Global Distribution and Clinical Features of Pythiosis in Humans and Animals. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 2, p. 182, 11 fev. 2022.
- ZHAO, Z. et al. Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6746, 23 out. 2014.