



**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 BIOCIÊNCIAS - 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 quereia 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
<i>Análise Bayesiana</i> (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 AFLP <i>in vitro</i>	67
<i>AFLP in vitro</i>	67
Análise de dimensionamento (PCA).....	68
Árvore 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).

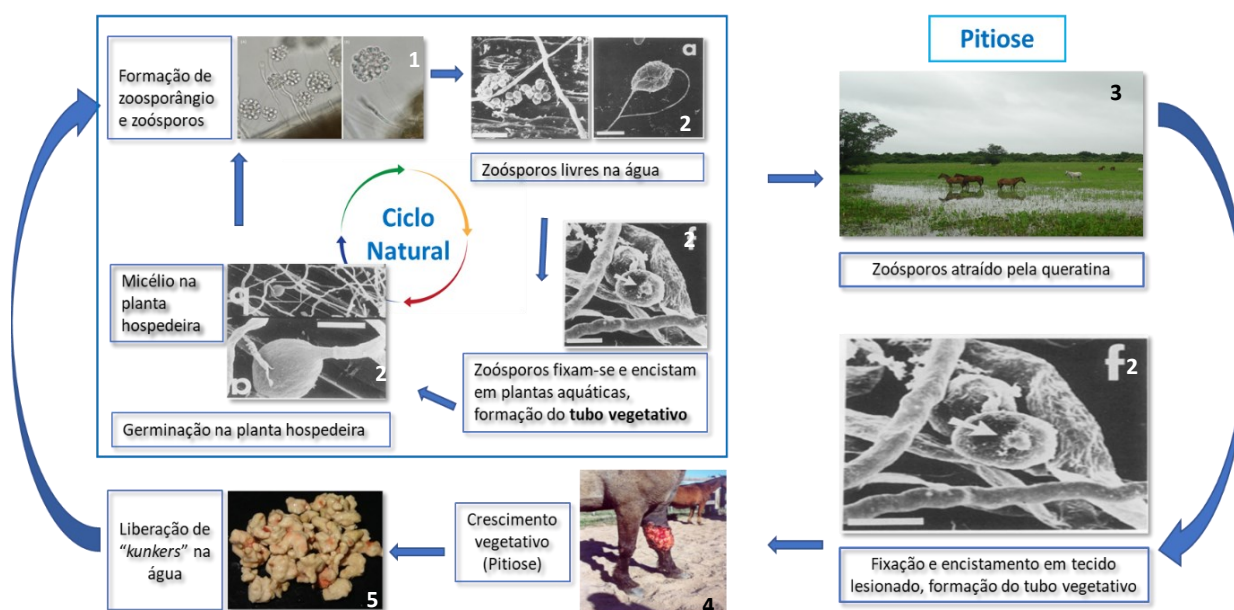


Figura 1. Ilustração do ciclo de vida de *P. insidiosum* e a ocorrência da infecção. Imagens provenientes de: 1. GAASTRA et al., 2010; 2. MENDOZA et al., 1996; 3. REVISTA VETERINÁRIA, 2017; 4. SANTURIO, 2004; 5. CARDONA et al., 2013.

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; SVELKOUK 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.

Justificativa

Casos de pitiose têm aumentado drasticamente em todo o mundo nos últimos anos, principalmente em cavalos e humanos. Estudos filogenéticos recentes mostram uma grande divergência intraespecífica, isolados anteriormente classificados como *Pythium insidiosum* mostrando perfil diferenciado para ser uma nova espécie, apontando que a doença pode ter mais de um agente etiológico. O perfil genético para os isolados brasileiros, até então é caracterizados por estudos usando um ou dois genes e mostra um único perfil genético. No entanto, recentemente nosso grupo isolou, de regiões com casos frequentes de pitiose no Brasil, a primeira cepa brasileira classificada no clado III (PAZ et al., 2021); no entanto, pouco tempo depois, um estudo norte americano mostrou-na como sendo classificada como uma nova espécie: *Pythium periculosum* (MIRAGLIA et al., 2022). Diante das limitações de informações estabelecidas pelas análises filogenéticas, baseadas em um ou dois genes, e a inexistência de relações genéticas envolvendo todo o genoma, principalmente para isolados brasileiros agente(s) etiológico(s) da pitiose, acreditamos que inferências filogenéticas multilocus e de genotipagem possam contribuir para esclarecimentos da dinâmica evolutiva e genotípicas nas diferentes localidades onde a doença ocorre.

Objetivo Geral

Analisar perfis genéticos do Complexo *Pythium insidiosum* de diferentes regiões endêmicas, com ênfase em isolados brasileiros.

Objetivos específicos

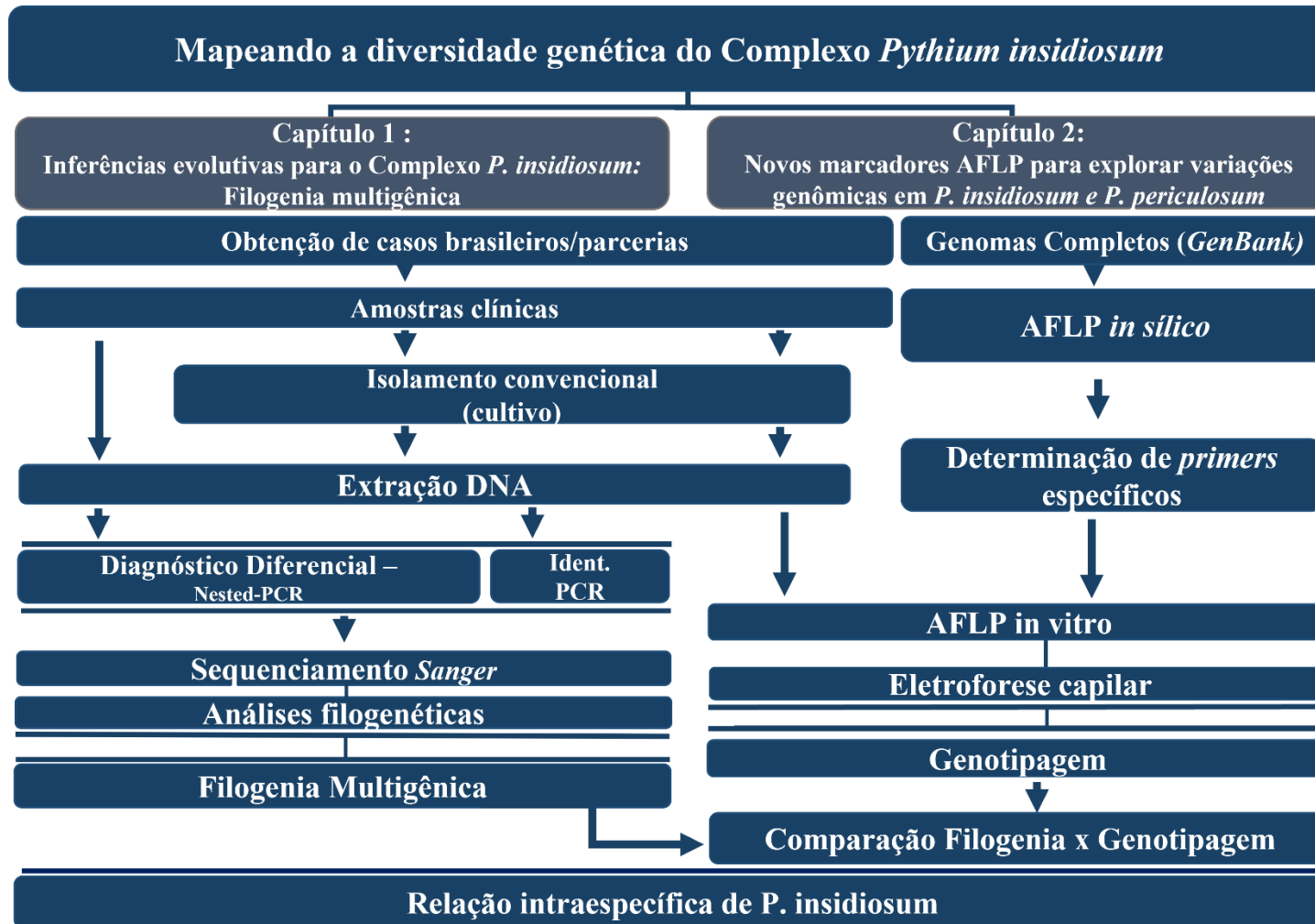
- Validar novos marcadores para estudos filogenéticos
- Traçar Inferência filogenéticas dos isolados;
- Determinar, por análises *in silico* e, a partir de genomas disponíveis na base de dados, marcadores sugestivos de polimorfismo;

- Inferir análise de genotipagem AFLP *in vitro*, a partir dos marcadores selecionados *in silico*;
- Comparar as relações intraespecíficas derivadas da genotipagem com resultados da filogenia.

Organograma do estudo

Para fins didáticos, que resulta em uma discussão clara e direcionada a cada análise, dividimos esse trabalho em dois capítulos. No primeiro, trabalhamos a distribuição global da espécie em uma abordagem filogenética. No segundo capítulo, o levantamento global é discutido na perspectiva genotípica. Ao final, fizemos uma conclusão comparando a relação intraespecífica pelas duas análises. Um esquema do projeto é apresentado abaixo (**Esquema 1**).

Esquema 1. Organograma dos estudos.



Atividades Extracurriculares realizadas

Atividades Docência	Atividades Extensão
• 2023 - Professora Bolsista nas disciplinas Microbiologia Médica – Biomedicina Microbiologia de Alimentos – Nutrição • 2022 -- Docência PAADS : Professora de Microbiologia Básica para o curso de Ciências Biológicas. • 2021/2022 - Professora Bolsista de Microbiologia Básica – Curso Ciências Biológicas	• Participação na disciplina da pós-graduação - Micologia Clínica – 2023 • Organização de Curso de Extensão “Práticas Laboratoriais de Microbiologia” – 2022; • Organização Projeto de Extensão: “Bem-Vindo ao quinto Reino” - 2021/2022; • Participação do Curso de Férias: “Virando a célula no avesso” – 2021; • Conclusão e homologação dos créditos em Disciplinas – 2021; • Organização Projeto de Extensão: “Coletiva-Mente” - 2020;
Eventos / Cursos/ Publicações	Participação em outros projetos de pesquisa
• 3 Resumo apresentado e publicado em anais Congresso (2020 - 2022); • 5 Participações em Eventos e Congresso (2020/2021); • 4 Cursos de longa duração realizados (2020-2022); • 3 Artigos publicados como co-autora (2021/2023); • 3 Palestras Apresentadas em Congressos (2022-2024); • 3 Artigo Submetidos 2023; • 1 artigo aceito para publicação 2024;	• Detecção molecular de <i>Cryptococcus</i> sp. em fezes de pombos em locais públicos na cidade de Botucatu – Mestrado/ IBB - 2020 – 2022; • Avaliação da Incidência de <i>Pythium insidiosum</i> às Magens do Rio Tietê e possíveis fatores ambientais associados – Mestrado/IBB – 2021 - 2023 • Diagnóstico Molecular de infecções negligenciadas: Criptococose e Pitiose – Doutorado/ VET. 2019 – 2023. • <i>Pythium insidiosum</i> E PITIOSE : UMA REVISÃO DE LITERATURA – Mestrado/VET – 2021-2023.

Figura 2. Para mais detalhes, acesse o currículo lattes disponível em <http://lattes.cnpq.br/4523415720558979> .

Referências Bibliográfica

- 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.
- BOGALE, M. et al. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. *Fungal diversity*, v. 23, p. 51–66, 3 abr. 2006.
- 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 *tefl* 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.

DURÁN, A. et al. AFLP analysis reveals a clonal population of *Phytophthora pinifolia* in Chile. *Fungal Biology*, v. 114, n. 9, p. 746–752, 1 set. 2010.

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, p. 1–16, 20 nov. 2010.

GARZÓN, C. D.; GEISER, D. M.; MOORMAN, G. W. Diagnosis and Population Analysis of *Pythium* Species Using AFLP Fingerprinting. *Plant Disease*, v. 89, n. 1, p. 81–89, jan. 2005.

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.

GRIL, T. et al. Fluorescent AFLP fingerprinting of *Monilinia fructicola*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 117, n. 4, p. 168–172, 1 ago. 2010.

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.

HERKERT, P. F. et al. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 35, n. 11, p. 1803–1810, 1 nov. 2016.

- 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.
- IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. Postgraduate Medical Journal, v. 70, n. 826, p. 558–560, 1994.
- 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, 2011.
- KAVITHA, P. G. et al. AFLP polymorphism and *Pythium* response in Zingiber species. Recent trends in horticultural biotechnology, Vol. II. ICAR national symposium on biotechnological interventions for improvement of horticultural crops: issues and strategies, Vellanikkara, Kerala, India, 10-12, January 2005, p. 497–503, 2007.
- 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. 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. 2021a.
- 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.
- NAJAFZADEH, M. J. et al. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Medical Mycology*, v. 48, n. 6, p. 800–806, set. 2010.
- 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 homoplasy: 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.
- 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. 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. Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes. *Em: [s.l.: s.n.]*. p. 141–217.
- 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.
- WARRIS, A. et al. Molecular Epidemiology of *Aspergillus fumigatus* Isolates Recovered from Water, Air, and Patients Shows Two Clusters of Genetically Distinct Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 9, p. 4101–4106, 1 set. 2003.
- 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.

CAPÍTULO I

Inferências evolutivas para o Complexo *Pythium insidiosum*: filogenia multigênica

Prado, AC¹; Garces HG¹; Yamauchi, D¹; Gasparini, GC¹; Krajaejun, T²; Yurayart, C³; Bagagli, E¹; Bosco, SMG^{1,4}; Chechi, JL⁵.

¹Setor de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paula, Brasil.

²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Hospital Ramathibodi, Universidade Mahidol, Bangkok, Tailândia.

³Centro de Pesquisa, Faculdade de Medicina, Hospital Ramathibodi, Universidade Mahidol, Bangkok, Tailândia;

⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paula, Brasil.

⁵Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Resumo

Pythium insidiosum é o agente causador da pitiose, uma doença que pode ser fatal em humanos e animais. É prevalente em regiões de clima tropical e subtropical, acomete equinos e cães, principalmente nos Estados Unidos e Brasil, e humanos na Índia e Tailândia, no entanto têm-se estendido para regiões temperadas. Na última década, estudos filogenéticos remanescentes mostravam a divisão intraespecífica em três clados, sendo clado I encontrado em toda América e clado II e III na Ásia. Entretanto, com aumento de números de casos e da complexidade dos estudos de relação intraespecífica, cepas do clado III têm sido frequentemente identificadas nas Américas, além de que, cepas que se alocavam nesse clado, vêm mostrando cada vez mais divergência entre si, a ponto de ser classificada como uma nova espécie: *Pythium periculosum*. Estudos moleculares avaliando polimorfismo de sequência têm contribuído para exatidão no diagnóstico e mais esclarecimentos evolutivos deste patógeno. Portanto, este estudo visa determinar as relações evolutivas intraespecíficas de isolados de *P. insidiosum*, de diferentes locais do globo, por uma abordagem multigênica. Foram empregadas abordagens filogenéticas por Máximo Verossimilhança (ML) e Bayseana (BA) e a Máxima Parsimônia (MP), utilizando genes codificantes estruturais conservados da α e β -tubulina, do Tef-1 α , bem como ITS, COXII. A filogenia individual de cada gene em todas as análises, bem como a filogenia concatenada, confirma a maior distância filogenética entre o clado III e os demais, corroborando para o estudo atual que o descreve

como espécie críptica. Dos genes analisados, Tef-1 α e ITS separou com alta PP e *Bootstrap*, os clados que indica *P. insidiosum* (I e II) de sua nova espécie críptica, *P. periculosum* (clado III), indicando bons candidatos para diferenciação do complexo. Já o gene COX II separa com grande suporte os três clados indicando uma boa região para estudos de mapeamento epidemiológico para o complexo.

Palavras-Chave: Phylogeny, oomycete, Pythiosis, clades, cryptic species, *Pythium periculosum*

Introdução

Pythium insidiosum é o agente responsável pela pitiose, uma doença que pode ser fatal para humanos e animais em regiões tropicais e subtropicais do globo (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022). Este patógeno pertence ao grupo dos oomicetos, conhecidos como falsos-fungos por compartilharem características morfológicas com o reino Fungi mas se distinguir destes por suas peculiaridades somático-estrutural e molecular, como a presença de celulose, hidroxiprolina e β -glucanas na composição da parede celular ao invés de quitina e a ausência de ergosterol na membrana plasmática, entre outras (BEAKES, 1989; BEAKES et al, 2012, 1987).

No continente americano, tendo Estados Unidos e o Brasil os países com maior incidência e prevalência da pitiose equina (YOLANDA & KRAJAEJUN, 2022), este microrganismo é conhecido por acometer principalmente cavalos e cães, tendo apenas um caso humano diagnosticado no Brasil por nosso grupo de pesquisa (BOSCO et al, 2005, MARQUES et al., 2006). No entanto, no leste asiático, em países como Índia e Tailândia, a pitiose é considerado um problema de saúde pública por afetar e se disseminar rapidamente em humanos e, por possuir o tratamento desafiador, muitos casos vem a óbito (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022). Os indivíduos são afetados principalmente por lesão subcutânea, comprometimento ocular e vascular bem como órgãos internos (CHITASOMBAT et al., 2020; GAASTRA et al., 2010b; KRAJAEJUN et al., 2006b; MENDOZA, LEONEL; AJELLO, L.; MCGINNIS, M, 1996). As diferenças genéticas e bioquímicas em relação aos fungos, principalmente pela ausência do ergosterol na membrana plasmática, molécula alvo dos fármacos antifúngicos, compromete o tratamento da pitiose, o que contribui para uma elevada taxa de mortalidade dos pacientes afetados (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022).

Estudos genômicos e transcriptômicos têm esclarecido mecanismos de patogenicidade para espécie e enriquecendo banco de dados, o que contribui para o diagnóstico rápido e preciso, além de possibilitar um melhor prognóstico ao paciente (KITICHOTIRAT et al., 2017; KRAJAEJUN et al., 2011, 2018b, 2020; PATUMCHAROENPOL et al., 2018; RUJIRAWAT et al., 2018b). A rápida evolução da doença exige diagnóstico diferencial, que pode ser feito empregando-se de exames imunológicos (imunodifusão, ensaio imunoenzimático ELISA) ou diagnóstico molecular (PCR e suas variações), ou ensaio proteômico (MALDI-TOF MS)(CHECHI et al., 2021; CHITASOMBAT et al., 2020; GAASTRA et al., 2010b; HTUN et al., 2020; JINDAYOK et al., 2009; KEERATIJARUT et al., 2013, 2014; KRAJAEJUN et al., 2018a; LOHNOO et al., 2014; MANI et al., 2019; RUJIRAWAT et al., 2017).

Nos últimos cinco anos houve um grande aumento global dos casos de pitiose, o que tem impulsionado estudos em relação a seu agente etiológico. Estudos genômicos, além de disponibilizar novos marcadores para um rápido diagnóstico, têm evidenciado três clados geograficamente distintos para *P. insidiosum*: clados I, II e III. Sendo comportados no clado I isolados de origem Americana e nos clados II e III, cepas de origem Asiática. Entretanto essas informações são limitadas pois se baseiam em análises filogenéticas de apenas quatro regiões gênicas, como o espaçador transcrito interno (ITS), região do espaçador intergênico (IGS), o *exo-1,3-β-glucanase* (*exo1*) e a região mitocondrial do citocromo oxidase II (COXII) (APPAVU et al 2020; AZEVEDO et al., 2012; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; RIBEIRO et al., 2017; SCHURKO et al., 2003a, 2003b).

Algumas regiões genômicas têm sido exploradas em grupos próximos para esta finalidade, como a região do genoma que codifica um dos fatores de alongamento da tradução (*Tef-1α*), responsável por ligar a aminoacil-RNAt ao ribossomo no processo de alongamento durante a tradução proteica (NEGRUTSKII; EL'SKAYA, 1998). Por apresentar lentas taxas de substituição de nucleotídeos durante o processo evolutivo, essa região gênica é promissora para traçar a filogenia em vários grupos relacionados (BRANDON MATHENY et al., 2007)(CASTELLANO; ELLIOTT; TRAPPE, 2018), inclusive para outras espécies de oomicetos como *Phytophthora* spp. (KROON et al., 2004)(VAN'T KLOOSTER et al., 2000), e mais recentemente foi introduzida para estudos dentro do gênero *Pythium* (KAMIKAWA et al., 2013).

Outras regiões genômicas codificantes das proteínas estruturais como α e β -tubulina, principais componentes dos microtúbulos, têm sido base nas relações filogenéticas entre espécies fúngicas como *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, entre outros (EINAX; VOIGT, 2003; KEELING, 2003; MINOR et al., 2016; SAMSON et al., 2004; TANG; JEEWON; HYDE, 2007; THON; ROYSE, 1999). Para os oomicetos, a filogenia baseada no gene da α e β -tubulina já foi usada para analisar a relação filogenética entre *Phytophythora ssp.* e o gênero *Pythium ssp.* (VILLA et al., 2006).

O aumento de estudos tem permitido identificar outros clados em regiões endêmicas de pitiose nas Américas, como mostra os diversos isolados do clado III nos EUA e o recente isolado do clado III no Brasil, onde até então havia um perfil genético homogêneo para espécie (clado I). Mais que isso, um trabalho recente analisou as divergências genéticas e proteicas em que esses isolados divergentes nas Américas, bem como outros asiáticos que se classificavam em clados próximos, apresentaram divergências suficientes para ser classificados como sendo uma nova espécie, sugerindo mais de um agente etiológico para a pitiose (PRESSER; GOSS, 2015; PAZ et al., 2021; MIRAGLIA et al., 2022).

Dentro dos microrganismos causadores de infecções fúngicas tropicais, muitos patógenos apresentaram divergências genéticas semelhantes, evidências que foram determinantes para entender a epidemiologia das doenças causadas, como ocorreu com o complexo *Sporothrix sp.* e *Cryptococcus sp.*, entre outros (LI et al, 2013; SASAKI et al., 2014).

Não se sabe, por exemplo, se as divergências genéticas intraespecíficas para *Pythium insidiosum* estão relacionados com o seu padrão de virulência e patogenicidade, que por sua vez explicaria a prevalência aos diferentes hospedeiros nos diferentes continentes, porém a origem e a identificação dos clados a que os isolados pertencem têm se mostrado cada vez mais importantes já que o tratamento imunoterápico em humanos, decorrente do perfil antigênico, mostrou resultados discordantes para os diferentes clados (CHINDAMPORN et al., 2009).

A identificação recente de divergência genética acentuada e a descrição de uma subespécie para *Pythium insidiosum* nos estimula a estudar suas relações intraespecíficas para os isolados em escala global. Investigações nesse sentido poderiam esclarecer a

história evolutiva dessa espécie bem como a contribuir para elucidar a epidemiologia da pitiose. Neste estudo buscamos explorar novas regiões genômicas codificantes conservadas a fim de analisar se elas mostram divergências genéticas para a espécie, de acordo com a região geográfica dos isolados e o que vem sendo sugerido, e, se em uma abordagem multilocus, combinada com regiões codificantes variáveis e regiões não codificantes, ainda sustentam esta hipótese.

Métodos

Obtenção e isolamento a partir do material clínico

Para este trabalho contamos com parcerias e colaborações de pesquisadores e profissionais veterinários já contatados das diversas regiões do Brasil. As amostras de equinos (“kunkers”) ou biopsias de pitiose em outras espécies de animais foram acondicionadas em frasco coletor universal, 50ml, contendo salina (0,9%) e cloranfenicol (50µg/ml) e enviadas para serem processadas em nosso laboratório.

Processamento laboratorial dos “kunkers” e identificação molecular

As amostras clínicas (“kunkers” ou tecido) retiradas da lesão cutânea foram transferidas para tubos cônicos estéreis de 50 ml e lavadas por pelo menos 3 vezes em solução salina estéril com cloranfenicol (50 µg/ml) agitado em vortex. Metade foi destinada a cultura e a outra metade encaminhada a extração do DNA para diagnóstico diferencial da pitiose para todas as amostras recebidas.

Cultivo microbiológico

Para cultura, os “kunkers” foram fragmentados com lâmina de bisturi em fragmentos de 2 mm, semeados em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose 4%, incubados a 37°C e avaliados diariamente. Colônias semelhante a *P. insidiosum*, juntamente com avaliação microscópica, foram re-isolados em ágar Sabouraud dextrose e encaminhada para análise molecular. Para a extração de DNA foi utilizado o kit comercial *NucleoSpin®Tissue* (Macherey-Nagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, e então submetidos a PCR com *primers* universais para os fungos ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3') (White et al., 1990) com perfil de ciclagem detalhado na tabela 2. *Amplicons* de aproximadamente 850 pb foram purificados com o kit comercial DNA Illustrate™ (GE Healthcare), e encaminhadas para sequenciamento Sanger em analisador 3500, de acordo com fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O eletroferograma foi editado no MEGA 11, e a identificação das espécies

realizada no *BLASTn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Amostras positivas para *P. insidiosum* foram utilizadas para análises *in vitro*. As sequências foram depositadas na base de dados *GenBank* do NCBI.

Nested-PCR

Foram realizadas diagnóstico diferencial a partir de amostras clínicas (*kunkers*), Nested-PCR, para entregar um rápido diagnósticos aos nossos parceiros e assim melhorar o prognóstico dos animais, estrategicamente, pela demora de crescimento em cultura e isolamento. As reações de Nested-PCR foram realizadas com a primeira rodada de PCR feita com os *primers* externos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') e ITS2P (5'-CCGCTTCACTCGCCGTTACT-3'), nas concentrações de 10 pmol/L, e a segunda rodada de PCR realizada com os *primers* internos Pi 1 (5'-TTCGTCGAACGGGACTGCT-3') e Pi 2 (5'-GCCGTACAACCCGAGAGTCATA-3'), nas mesmas concentrações, gerando um *amplicon* de 105 pb, específico para *P. insidiosum* conforme e perfil de ciclagem já descrito por Grooters & Gee (2002). As reações de PCR foram realizadas em um Veriti Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA) com Go-taq Master Mix (Promega) e visualizadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Condições de cultura e extração de DNA

Para este estudo utilizamos 53 isolados de *P. insidiosum* provenientes de diversos países, como ilustrado no mapa 1 e com informações na Tabela 1. Parte das amostras foram processados no Laboratório de Fungos ambientais e Micologia Médica, Universidade Estadual Paulista, UNESP/Botucatu/São Paulo - Brasil e parte realizada no Pythiosis Lab, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, em Bangkok/ Thailand. Todos os isolados foram previamente identificados por ITS do DNA ribossomal, utilizando o *primer* universal ITS1-4, com sequencias e perfil de ciclagem indicada na Tabela 2. As amostras foram cultivadas em ágar Sabouroad, a 25°C por 7 dias e, posteriormente, submetidos à extração do material genético seguindo o protocolo de extração Quick CTAB usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (ZHANG et al., 2015).



Figura 1. Localização global da amostragem utilizada neste trabalho. Mapa gerado no Visme-6.0.5.

Desenho de *primers* e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as regiões gênicas do Tef-1 α , da α e β -tubulinas foram desenhados *primers* específicos para *P. insidiosum* a partir de genoma de referência predito depositado no GenBank (Pi-S, GenBank access: BBXB000000000.1). O estudo *in silico* foi realizado utilizando o *software* MEGA X (KUMAR et al., 2018), onde as regiões foram alinhadas e analisadas manualmente. Os *primers* desenhados foram analisados quanto à sua especificidade e qualidade, considerando formação de dímeros e *hairpins*, utilizando as ferramentas *Primer-BLAST* e *OligoAnalyzer Tool* (NCBI, 2024; Integrated DNA Technologies, Inc. © 2024). Para α -Tubulina fez-se necessário dois conjuntos de *primers*, pois, algumas cepas do clado III apresentavam muitos polimorfismos na região utilizada para este gene.

As sequências de *primers* específicos aqui desenhados, bem como seus perfis de ciclagem se encontram na **Tabela 2**.

Para a amplificação do gene parcial COX II e da região ITS utilizamos os conjuntos *primer* FM58 e FM66 descrito por Villa e colaboradores (2006) e ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990), respectivamente.

As reações de PCR foram feitas em termociclador modelo Veriti 96 wells (Applied Biosystems, Ca, EU), empregando-se GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison USA), 10mM de cada *primer*, em volume total de 25 μ L.

Sequenciamento e análise filogenética

Os *amplicons* obtidos foram purificados empregando-se kit comercial DNA Illustra TM (GE Healthcare) e para análise da concentração e qualidade do DNA adotamos o critério de análise por espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare) em comprimento de onda de 260 nm, a fim de se ajustar a concentração necessária para a reação de sequenciamento (ZHANG et al. 2009). O sequenciamento foi realizado junto ao Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia/UNESP, segundo a plataforma do sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram visualizadas e alinhadas pelo programa MEGA X e então submetidas ao *BLASTn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para confirmar a identidade molecular dos *amplicons* de *P. insidiosum* obtidos, bem como para seu depósito no *Genbank*.

Análises Filogenéticas

Para testar diferentes suposições e modelos evolutivos, além de analisar a robustez dos resultados foram traçadas três inferências filogenéticas com abordagens evolutivas diferentes, todas foram realizadas a cada um dos genes individualmente e, posteriormente, de forma concatenada.

Pelo fato de alguns isolados recentes da Tailândia não apresentarem a região gênica COX II ainda sequenciadas, a análise concatenada foi realizada com uma matriz com COX II incluso, porém com esses isolados ausentes, e uma segunda análise concatenada, na ausência do gene COXII, porém com esses isolados recentes da Tailândia, para confirmar a classificação desses novos isolados frente a análise multigênica e, ainda, se a presença do gene COX II modifica a topologia da árvore para filogenia de *P. insidiosum*.

Máxima Verossimilhança

As sequências foram alinhadas pelo algoritmo *Clustal W* para montagem da matriz para cada um dos genes isolados, identificado o melhor modelo evolutivo pelo critério de informação de Akaike (AIC) para cada uma das matrizes, e posteriormente inferida a filogenia utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML, *Maximum Likelihood*) e 5000 réplicas de *bootstrap* (btp) (KIMURA, 1980, HARRIS et al 1998). Posteriormente a análise foi empregada para a matriz multigênica, seguindo a mesma metodologia. Para todas as matrizes foram adicionadas as respectivas sequências gênicas de duas espécies filogeneticamente relacionadas a *P. insidiosum* como grupo externo: *Phytophthora sojae*

e *Phytophthora infestans* obtidas no Genbank (dados contidos na **Tabela 1**). Tanto a identificação do melhor modelo evolutivo quanto a inferência evolutiva foi realizada pelo programa MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Análise Bayesena

Análise Bayesiana (BA) foi realizada no *MrBayes* 3.2.6 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001) pelo processador *online CIPRES*, para cada matriz gênica, nos seus respectivos modelos evolutivos determinados pelo MrModelTest (NYLANDER, 2004) e inferidas as árvores por uma busca heurística, com adições aleatórias construídas em cada uma das 1000 réplicas de *bootstrap*. O suporte de clado foi avaliado através de Probabilidades Posteriores (PP), obtidas a partir de um conjunto de 1.000.000 gerações de pesquisa *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC - SMITH, 2005) amostradas a cada 1000, após descartar 25% dos resultados iniciais como *burn-in*.

Análise de Máxima Parcimônia

Foram feitas análises de Máxima Parcimônia (MP) para as matrizes gênicas individuais e concatenada, usando busca heurística com 5000 réplicas e adição aleatória e gerado consenso *strictus* usando PAUP 4.0 (SWOFFORD, 2002).

Tabela 1. Dados dos 53 isolados de *Pythium insidiosum* (americanos e asiáticos) e *outgroups* para as análises filogenéticas usados em nosso estudo. Foi mantida a nomenclatura das cepas disponível no NCBI, contidos na primeira coluna da tabela.

Isolate	Strain	Clade (ITS)	GenBank code ITS	GenBank code COX II	GenBank code Tef-1 α	GenBank code β -Tub	GenBank code α -Tub	Source	País de Origem
Pi07	CBS573.85	I	AB971180	LC553028	ON303926	ON303861	OP132684	Equine	Costa Rica
Pi08	CBS580.85	I	AB898107	LC553029	ON303927	ON303860	OP132657	Equine	Costa Rica
Pi10	ATCC200269	I	AB898108	LC553024	ON303928	ON303859	OP132685	Human	USA
Pi19	Pi19	II	AB898113	WGS contigs BCFS01008340 BCFS01011754	ON303929	ON303858	OP132658	Human	Thailand
Pi20	MCC 18	II	AB971183	KF758495	ON303930	ON303857	OP132659	Human	Thailand
Pi32	P34	II	AB898121	LC553041	ON303931	ON303856	OP132660	Human	Thailand
Pi35	Pi-S	II	AB898124	LC553043	ON303932	ON303855	OP132661	Human	Thailand
Pi36	ATCC64221	II	LC199883	LC553026	ON303934	ON303898	OP132662	Equine	Australia
Pi38	CBS101039	II	AB898125	OP160029	ON303933	ON303897	OP132663	Humano	India
Pi40	CBS777.84	II	LC199886	LC553030	ON303935	ON303854	OP132664	Mosquito Larvae	India
Pi43	Pi43	II	AB898126	OP160030	ON303936	ON303894	OP132665	Environmental	Thailand
Pi45	MCC13	III	AB971186	LC553036	ON303937	ON303899	OP132666	Human	Thailand
Pi46	SIMI3306-44	III	AB971187	LC553045	ON303938	ON303901	OP132667	Human	Thailand
Pi47	SIMI2921-45	III	AB971188	LC553044	ON303939	ON303902	OP132668	Human	Thailand
Pi48	SIMI4763	III	AB971189	KF758532	ON303940	ON303905	OP132669	Human	Thailand
Pi49	SIMI7695-48	III	AB898127	LC553046	ON303941	ON303903	OP132670	Human	Tailândia
Pi50	ATCC90586	III	AB971190	LC553027	ON303942	ON303904	OP132671	Human	USA
Pi51	Pi51	III	AB898128	OP168826	ON303943	ON303900	OP132672	Environmental	Thailand
Pi52	Pi52	II	LC199888	OP168827	ON303944	ON303895	OP132673	Human	Thailand
Pi53	Pi53	II	LC199889	LC553042	ON303945	ON303896	OP132674	Equine	Thailand
KU40017.1	KU40017.1	II	MT459309		ON303947	ON303868	OP132675	Equine	Thailand

Pi56	KU40017.2	II	MT459310	OP168828	ON303948	ON303867	OP132686	Equine	Thailand
Pi74	KU40017.3	I	MT459311	LC553035	ON303949	ON303866	OP132676	Dog	Thailand
KU40017.4	KU40017.4	II	MT459312		ON303950	ON303865	OP132677	Equine	Thailand
Pi76	KU40017.5	II	MT459313	OP168829	ON303951	ON303864	OP132678	Equine	Thailand
KU40018.1	KU40018.1	II	MT459314		ON303952	ON303863	OP132679	Equine	Thailand
KU40018.2	KU40018.2	I	MT459315		ON303953	ON303862	OP132680	Equine	Thailand
KU40019.1	KU40019.1	I	MT459316		ON303954	ON303870	OP132681	Equine	Thailand
KU40019.2	KU40019.2	II	MT459317		ON303946	ON303869	OP132682	Dog	Thailand
KU40020.1	KU40020.1	II	MT459318	OP168830	ON303955	ON303906	OP132683	Equine	Thailand
Eq-02	Eq-2	I	KP842833	KP842873	MT939906	ON303889	OP080628	Equine	Brazil, SE
Eq-04	Eq-4	I	KP842835	KP842875	MT939907	ON303890	OP093701	Equine	Brazil, SE
Eq-05	Eq-5	I	KP842836	KP842876	MT939908	ON303888	OP093702	Equine	Brazil, SE
Eq-06	Eq-6	I	KP842837	KP842877	MT939909	ON303887	OP093703	Equine	Brazil, SE
Eq-09	Eq-9	I	KP842840	KP842880	ON303907	ON303886	OP093704	Equine	Brazil, SE
Eq-10	Eq10	I	KP842841	KP842881	ON303908	ON303891	OP093705	Equine	Brazil, SE
Eq-11	Eq11	I	KP842842	KP842882	ON303909	ON303885	OP093706	Equine	Brazil, SE
Eq-12	Eq12	I	KP842843	KP842883	ON303910	ON303884	OP093707	Equine	Brazil, SE
Eq-13	Eq13	I	KP842844	KP842884	ON303911	ON303892	OP093708	Equine	Brazil, SE
Eq-15	Eq15	I	KP842845	KP842885	ON303912	ON303883	OP093709	Equine	Brazil, SE
Eq-16	Eq16	I	KP842846	KP842886	ON303913	ON303882	OP093710	Equine	Brazil, SE
Eq-20	Eq20	I	KP842847	KP842887	ON303914	ON303881	OP093711	Equine	Brazil, SE
Eq-22	Eq22	I	KP842849	KP842889	ON303915	ON303893	OP093712	Equine	Brazil, SE
Eq-24	Eq24	I	KP842850	KP842890	ON303916	ON303880	OP093713	Equine	Brazil, SE
Eq-25	Eq25	I	MT237220	MT811058	ON303917	ON303879	OP093714	Equine	Brazil, SE
Eq-26	Eq26	I	MT237290	MT811059	ON303918	ON303878	OP093715	Equine	Brazil, SE
Eq-27	Eq27	I	MT672705	ON303956	ON303956	ON303877	OP093716	Equine	Brazil, SE
Eq-28	Eq28	I	MT672706	MT818228	ON303920	ON303876	OP160023	Equine	Brazil, SE
Eq-29	Eq29	I	MT237312	MT818229	ON303921	ON303875	OP160024	Equine	Brazil, SE
Eq-30	Eq30	I	MT237436	MT818230	ON303922	ON303874	OP160025	Equine	Brazil, SE
Eq-31	Eq-31	I	MT672701	MT818231	ON303923	ON303873	OP160026	Equine	Brazil, SE
Eq32	eq32	I	MT672702	MT818232	ON303924	ON303872	OP160027	Equine	Brazil, SE
DOG01	Can-1	I	KP842851	KP842891	ON303925	ON303871	OP160028	Dog	Brazil, SE
<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4	–	ASM14294v1	–	–	–	–	Potato late blight	–
<i>Phytophthora Sojae</i>	P6497	–	AAQY02	–	–	–	–	From the Oak	–

Tabela 2. Primers para identificação dos isolados, primers específicos para *P. insidiosum*, e primers para verificação das regiões degeneradas e seus respectivos perfis de ciclagem. * primer da α -tubulina com base degenerada.

Primers	(5'-3')	PCR profile
ITS4 ITS 5	TCCTCCGCTTATTGATATGC GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	1x95°C/1min; 35x95°C/40s; 1x55°C/50s; 1x72°C/50s; 1x72°C/5min
FM58 FM66	CCACAAATTTCACTACATTGA TAGGATTTCAAGATCCTGC	1x95°C/1min; 35x95°C/40s; 1x55°C/50s; 1x72°C/50s; 1x72°C/5min
PiTEF-1 α – F PiTEF-1 α – R	CTATATGGATACGTGCAAGG GCGTCGAGGATCGTGTAACC	1x95°C/1min; 35x95°C/40s; 1x55°C/50s; 1x72°C/50s; 1x72°C/5min
Pi α -Tub – F Pi α -Tub – R	TCATCTCGTCGCTCACGACG GCTTGGCGTACATGAGATCG	1x95°C/1min; 35x95°C/40s; 1x55°C/50s; 1x72°C/50s; 1x72°C/5min
Pi α -2Tub – F Pi α -2Tub – R	CAGGTCATCTCGTCGCTACG* GCTTGGCGTACATGAGATC*	1x95°C/1min; 35x95°C/40s; 1x55°C/50s; 1x72°C/50s; 1x72°C/5min
Pi β -Tub – F Pi β -Tub – R	AAGGGTCACTACACGGAGG GTTACCAATGAACGTCGTCG	1x95°C/1min; 35x95°C/40s; 1x55°C/50s; 1x72°C/50s; 1x72°C/5min

Resultados

Os amplicons tiveram de tamanho médio de 503 pb para α tubulina, 803 pb para β tubulina e 539 pb para Tef-1 α , e estão ilustrados na **Figura 1**.

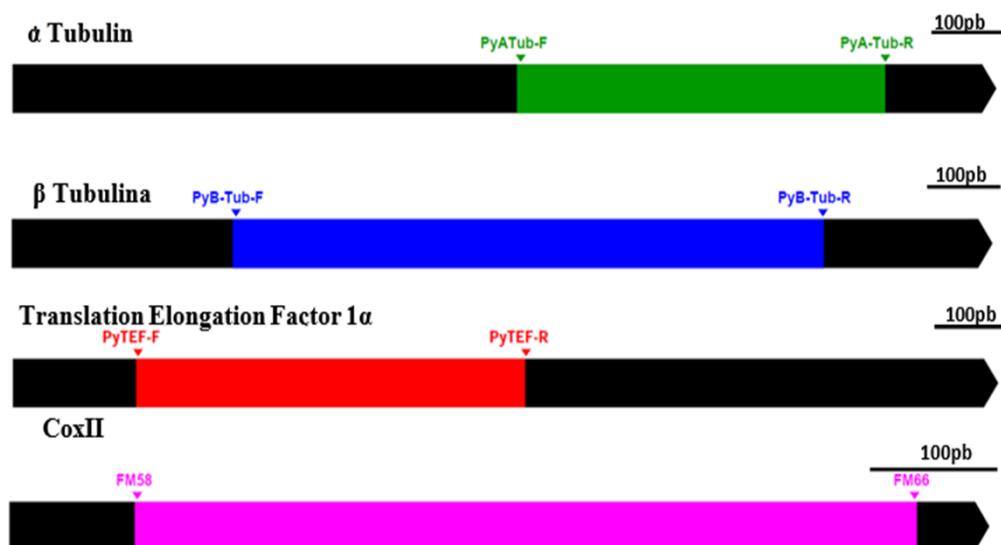


Figura 1. Esquema indicando os fragmentos sequenciados de cada gene, feito pelo *software on-line Exon-Intron graphic maker*. Em verde representa o segmento do gene parcial amplificado para α tubulina, em azul representa o fragmento da β tubulina. Em vermelho o fragmento do gene Tef-1- α . Na parte superior à direita de cada gene pode se observar a escala equivalente a 100pb.

Análises Filogenéticas

Máxima Verossimilhança para genes individuais (Figura 2)

Para matriz gênica de α -tubulina, o melhor modelo evolutivo encontrado foi Tamura-Nei com distribuição Gama (T93+G), com taxa estimada de transição/transversão (R) de 2,32, com maior frequência de substituição T/C, de 0,3. A análise baseada neste gene sustenta com 95,9% de *bootstrap* (btp) (Figura 2-A) a topologia de árvore já descrita para espécie, sendo três clados (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011). No entanto, cepas do clado asiático II se mostram agora parafiléticas 77,9% de btp, onde dois isolados da Austrália e Índia se mostraram distintas filogeneticamente das demais do clado II. As demais cepas demonstrativas do clado II se alocaram no mesmo clado I, mostrado na Figura 2-A (77,84 btp). Apesar de contar uma história evolutiva um pouco diferente das que vinha sido mostrada para cepas asiáticas do clado II, com base neste gene, cepas Americanas estabelecem relação evolutiva mais próxima com as cepas Asiáticas do clado II, resultados semelhantes são mostrados nas filogenias pelo gene COXII, ITS e 1,3-beta-

glucanase (AZEVEDO et al., 2012; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; MAR HTUN et al., 2021).

Com base na matriz gênica da β -tubulina, melhor modelo evolutivo foi Tamura-Nei com distribuição Gama (T92+G), apresentando taxa estimada de transição/transversão (R) de 2,37, sendo taxa de substituição T/C e C/T mais expressivos, 0,37 e 0,25 respectivamente. Nesta análise, cepas do clado II se mostram parafiléticas (Figura 2-B), e os isolados da Austrália e Índia tiveram divergências dos demais isolados do seu clado, com (67% *bootstrap*). Outro dado interessante é que este gene se diverge entre isolados do clado I, que se subdivide em 2 (90,84btp). O clado III mostra-se mais distantes filogeneticamente dos demais isolados com 100% de suporte de *bootstrap*.

Para a filogenia baseada em Tef-1 α , o melhor modelo evolutivo encontrado foi *Tamura 3-parameter*, com distribuição gama e sítios invariáveis (T92+G+I). A taxa estimada de Transição/Tranversão (R) foi de 1,95, e a taxa estimada de substituição foi mais expressiva de A/G e T/C (0,195 para ambos). Os isolados dividem-se em apenas dois clados (Figura 2-C), sendo que os clados clássicos I e II não apresentaram divergência genética para este gene, resultado sustentado com mais de 86% de *bootstrap*, e o clado III se mostra geneticamente distante de todos os outros isolados, com quase 89% de *bootstrap*.

Para a filogenia pela região codificante da subunidade II do citocromo oxidase, melhor modelo encontrado foi *Tamura 3-parameter* e distribuição gama (T92+G), com taxa de transição/transversão estimada de 0,74, com maiores frequências de substituição C/T e G/A, sendo 0,17 para ambos. Com base na inferência Máxima Verossimilhança para este gene, a espécie se divide em três clados (Figura 2-D). Por este gene o clado I e II apresentam-se como grupo irmão, geneticamente mais próximo, e o clado III mais distante, assim como em todas os outros genes. Além disso pelo gene COXII é possível verificar divergência genética dentro dos próprios clados: clado I, composto majoritariamente por cepas Americanas, mostrou-se subdividido em dois grupos, sustentado por 90% de *btp*, o clado II também se divide em dois (87% *btp*), sendo um deles composto por cepas indiana e da Australia; o clado III, por sua vez, também se subdividiu em dois clados bem sustentados (99% *bootstrap*).

Para filogenia Máxima verossimilhança para ITS, o melhor modelo evolutivo foi Hasegawa-Kishino-Yano com distribuição gama e sítio invariáveis (HKY+G+I), com taxa estimada de transição/tranversão (R) de 1,01, com maior frequência de substituição

A/G E C/T, 0,14 e 0,15, respectivamente. ITS sustenta a divisão em 3 clados (Figura 2-E), em que o clado I mostra origem evolutiva do clado II, e o clado III apesar de monofiléticos aos demais, apresenta-se mais distante evolutivamente. Apesar de expressar a classificação clássica, o ITS não demonstra a diversidade dentro de cada clado, como mostra os demais genes aqui estudados.

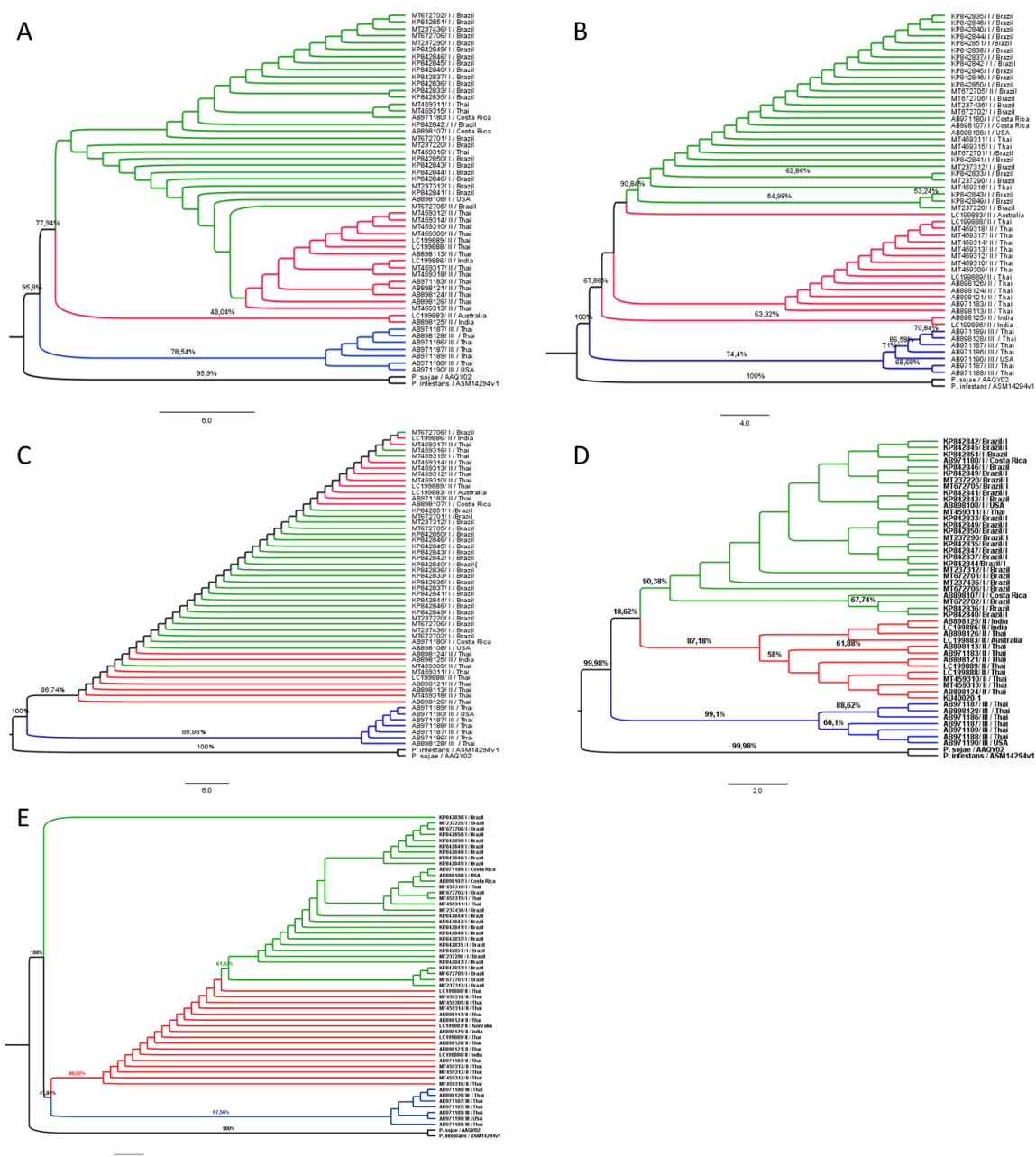


Figura 2. Análise filogenética por ML com genes individuais. **A** por α -tubulina, **B** por β -tubulina, **C** por TEF-1 α , **D** por COX II, **E** por ITS. As diferentes cores representam a divisão clássica: em verde são cepas clado I, vermelho clado II e em azul, cepas clado III. Foram mantidas as porcentagens de *bootstrap* acima de 50% dos ramos.

Máxima Verossimilhança Concatenada

A matriz concatenada multigênica incluindo o gene COX II contou com 49 taxons, sendo 2 grupos externos, com 2454 pb e desses, 725 sítios foram variáveis e 326 sítios foram informativos. O melhor modelo encontrado para matriz multigênica, incluindo o gene COX II, foi *General Time Reversible*, com distribuição gama com sítios invariáveis (GTR +G+I), com taxa de transição/transversão (R) de 0,97, com maiores taxas de substituição entre C/T e T/C com 18% e 16% respectivamente. A frequência nucleotídica foi: A = 22.38%, T = 27.45%, C = 24.36%, e G = 25.81%.

Estimativa do padrão de substituição de nucleotídeos				
De\Para	A	T	C	G
A	-	<i>7,0362</i>	<i>6,2452</i>	7,2257
T	<i>5,7362</i>	-	16,5711	<i>6,6173</i>
C	<i>5,7362</i>	18,6698	-	<i>6,6173</i>
G	6,2636	<i>7,0362</i>	<i>6,2452</i>	-

Tabela 3. Padrão de substituição com gene COXII na matriz. Cada entrada mostra a probabilidade de substituição (r) de uma base (linha) para outra base (coluna). As taxas de diferentes substituições transicionais são mostradas em negrito e as de substituições transversais são mostradas em itálico.

A matriz concatenada sem o gene COX II contou com 55 taxons, sendo dois grupos externos, contendo 1953pb e desses, 649 foram variáveis, dentre eles 294 sítios informativos. O melhor modelo evolutivo foi *Tamura 3-parameter* com distribuição gama (TN93+G) com parâmetro AICc = 14524.246 (*Akaike Information Criterion*) e valor de *Maximum Likelihood* = -7149.000 (lnL). A taxa de transição/ transversão (R) de bases foi de 1,04 e maiores taxas de substituição entre T/C e C/T, sendo 20% e 17%, respectivamente (Tabela 2). A frequência nucleotídica foi: A = 19.95%, T = 23.89%, C = 27.79% e G = 28.38%.

Estimativa do padrão de substituição de nucleotídeos				
De\Para	A	T	C	G
A	-	<i>5,7997</i>	<i>6,7462</i>	7,8694
T	<i>4,8428</i>	-	20,4556	<i>6,8908</i>
C	<i>4,8428</i>	17,5854	-	<i>6,8908</i>
G	5,5306	<i>5,7997</i>	<i>6,7462</i>	-

Tabela 4. Padrão de substituição na ausência do gene COXII na matriz. Cada entrada mostra a probabilidade de substituição (r) de uma base (linha) para outra base (coluna). As taxas de diferentes substituições transicionais são mostradas em negrito e as de substituições transversais são mostradas em itálico.

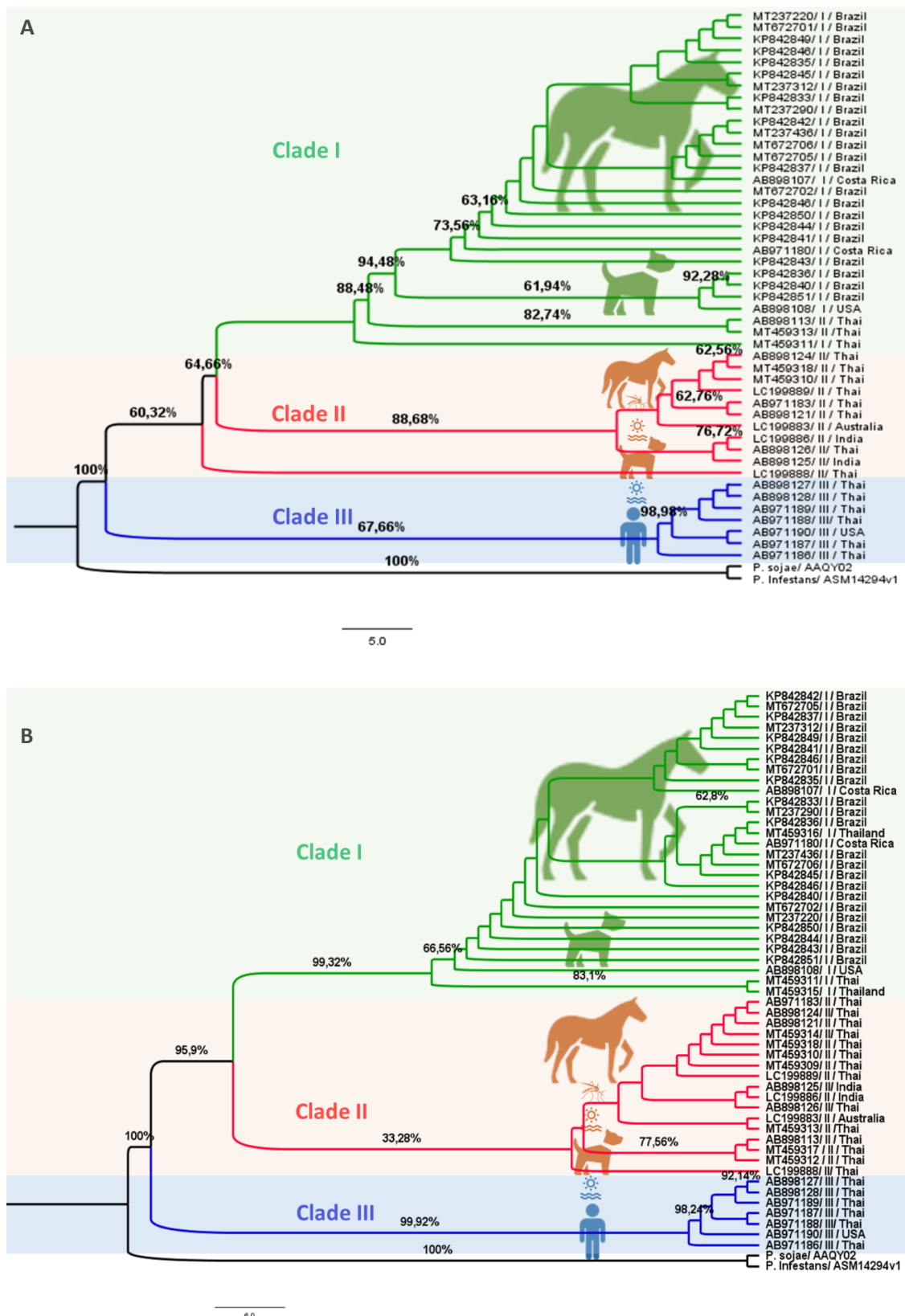


Figura 3. A- Árvore filogenética resultante da análise Máxima Verossimilhança concatenada dos 5 genes. B - Análise Máxima verossimilhança concatenada, na ausência da região de COX II. As diferentes cores representam a divisão clássica: em verde são cepas clado I, vermelho clado II e em azul, cepas clado III.

Análise Bayeseana (Figura 4)

De forma geral a filogenia por inferência Bayeseana corrobora os resultados da Máxima Verossimilhança. Para o gene da α -tubulina os resultados explicitam a proximidade genética do clado I e II, no entanto mostra isolados brasileiros se divergindo desses dois clados. Além disso a maior distância filogenética do terceiro clado é mantida (0,87 PP) (**Figura 4-A**). Para β -tubulina o padrão de topologia que divide a espécie em três clados foi corroborado com mais de 0,8 de PP. Sendo clado I e II, grupos irmãos com 0.9 de PP. Para este gene, um isolado brasileiro Eq02 (KP842833) se mostrou mais próximo ao clado III (**Figura 4-B**).

Pela análise Bayeseana a topologia da árvore foi idêntica para Tef-1 α e ITS e mostra as cepas do clado I e II formando um grande clado politômico, enquanto as do clado III se separam com alta probabilidade *posteriori* (0,87/1,0) (Figura 4- C e E).

Pela análise de Bayeseana pelo gene COX II, a filogenia de *P. insidiosum* se mantém corroborando resultados de estudos anteriores, os clados se mostraram monofiléticos entre si (PP= 1,0). Além disso, a bayeseana mostra diferenças filogenéticas dentre alguns isolados brasileiros, com probabilidades posteriores acima de 80% de probabilidade *posteriori*, sugerindo diferenças genéticas entre as cepas brasileiras (PP= 0,83 e 0,97) (**Figura 4 – D**).

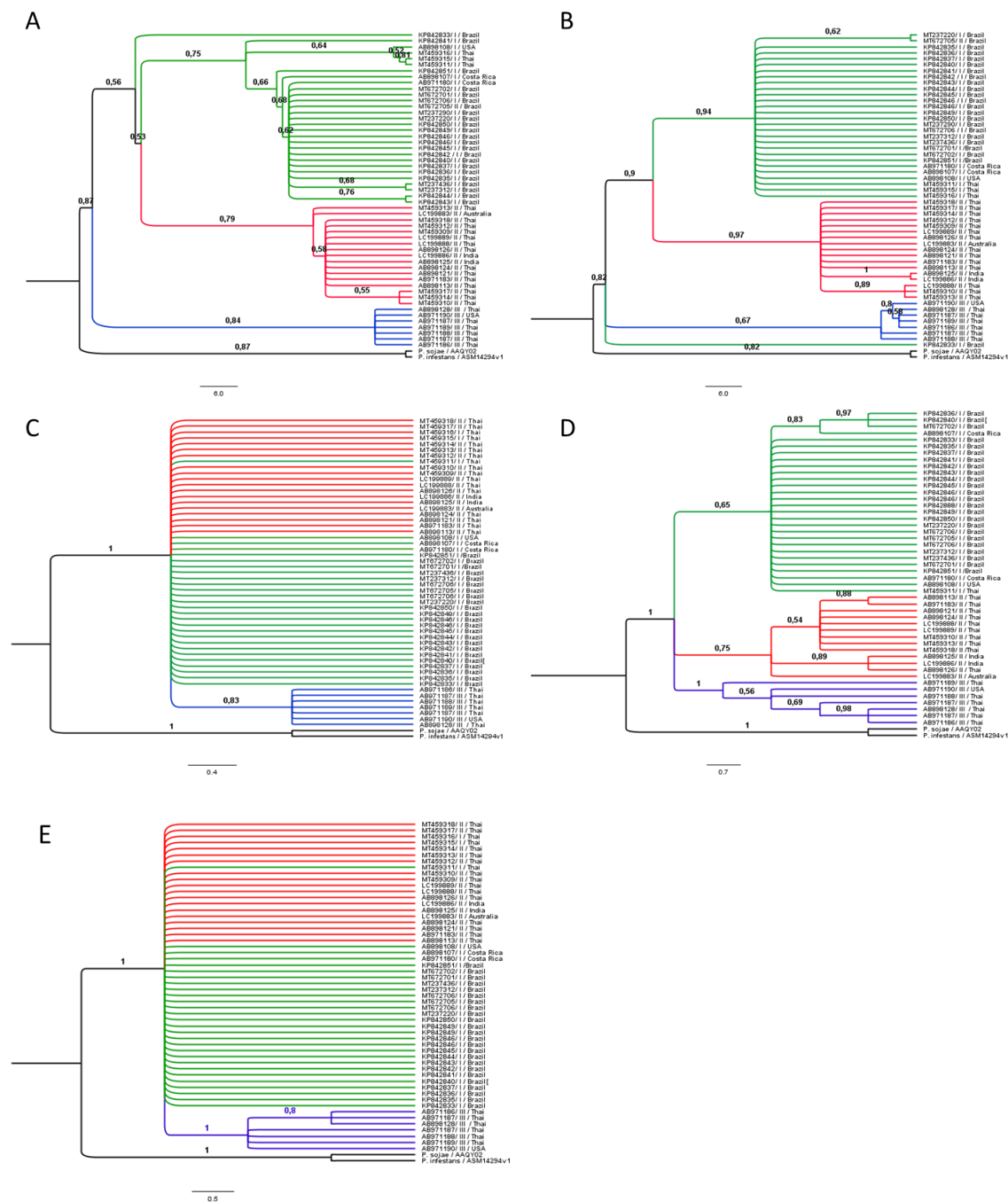


Figura 4. Análise Bayesiana com genes individuais. **A** por α -tubulina, **B** por β -tubulin, **C** por TEF-1 α , **D** por COX II, **E** por ITS. Foram mantidos valores de Probabilidade *Posteriori* acima de 0,50 indicada nos ramos. As diferentes cores representam a divisão clássica: em verde são cepas clado I, vermelho clado II e em azul, cepas clado III.

Bayseana Concatenada (Figura 5)

A análise Baysena foi realizada com matriz gênica contendo o gene COXII e outra sem, e teve diagnósticos de convergência médio de ESS (ESS= *Estimated Sample Size*) = 1961,93 e 2557,59 e PSRF (PSRF= *Potential Scale Reduction Factor*) = 1.0 para as duas matrizes gênicas, mostrando confiabilidade e robustez nas análises.

Na ausência do gene COX II (**Figura 5-A**), a filogenia de *P. insidiosum* se mantém corroborando resultados de estudos anteriores dividindo a cepas em três clados, tendo os isolados do clado I e II mais próximos entre si (PP= 1,0) indicando mesma origem clonal, já o clado III se mostra distante filogeneticamente ao clado I bem como ao clado II (PP= 1,0).

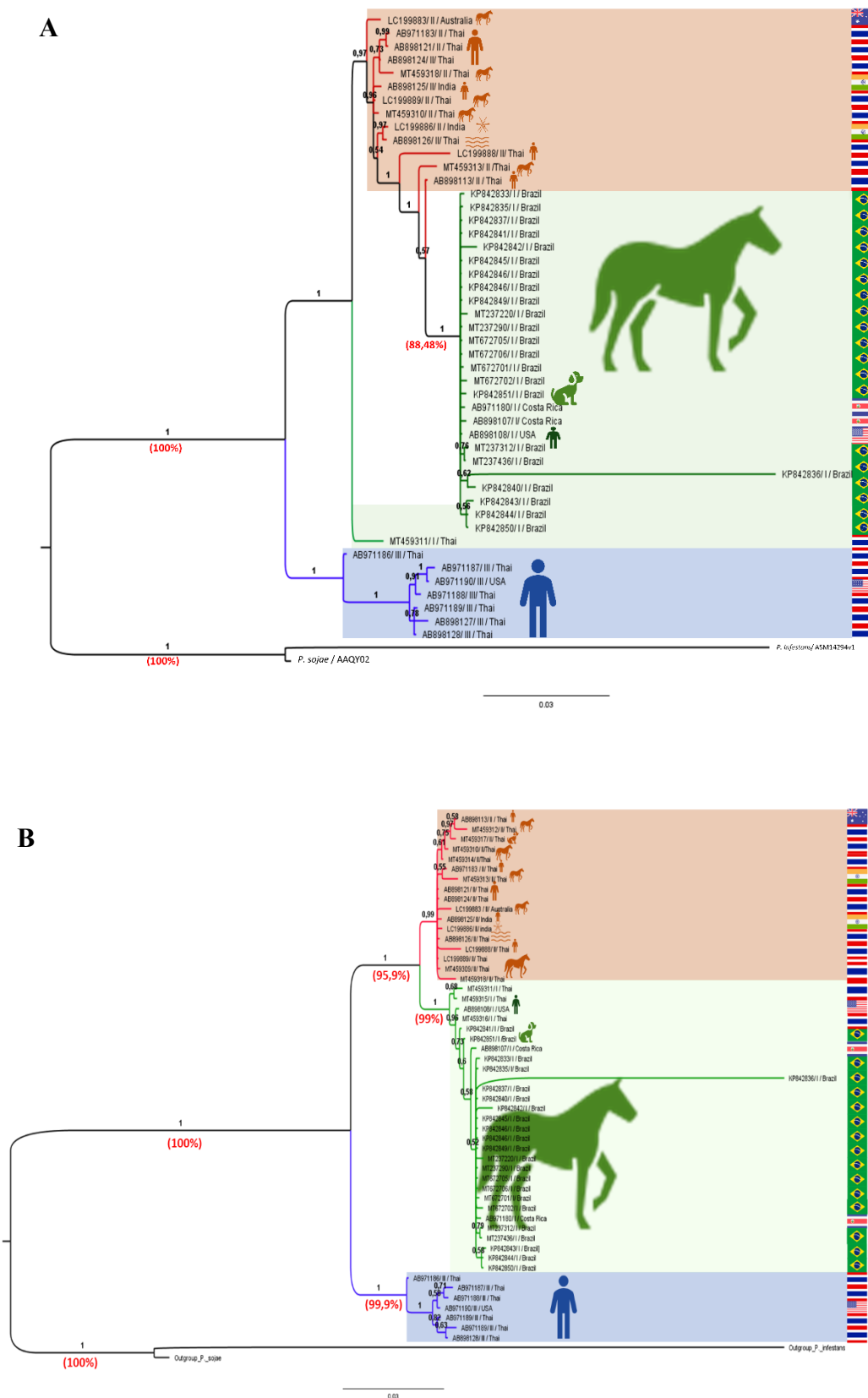


Figura 5. A - Análise Baysiana concatenada para os 5 genes. **B** - Análise Bayseana concatenada na ausência do gene COX II. Para fins comparativos, nessas árvores são indicados os ramos sustentados pela ML, com valores de *bootstrap* abaixo de cada ramo (em vermelho). As diferentes cores dos ramos representam a divisão clássica: em verde são cepas clado I, vermelho clado II e em azul, cepas clado III.

Com a adição do gene COX II, a topologia se alterou em relação aos clados I e II. A cepa tailandesa representante do clado I se mostra divergente de todos os clados (PP= 1.0). Outro dado interessante foi que com a adição de COXII houve mais ramificações entre as cepas do clado II e o isolado australiano se mostra divergente dos tailandeses e indianos (PP= 0,97).

Além disso, essa filogenia sugere que isolados americanos do clado I tiveram origem clonal a partir do clado II, além de confirmar que os isolados americanos são monofiléticos (PP=1,0) e a cepa tailandesa representativa do clado I, se difere de todos os clados clássicos (PP=1,0) (**Figura 5- B**).

Máxima Parcimônia

As árvores mais parcimoniosas são mostradas abaixo para cada um dos genes isolados (**Figura 6**). Pelos genes α , β -tubulina e ITS (Figura 6: A, B e E) temos resultados semelhantes às análises Bayesiana, os três clados clássicos são mantidos, porém existem cepas do clado I que se diferenciam não agrupando em nenhum clado. Pelo Tef-1 α o clado I se separa em 2 clados, um se mostra como grupo irmão ao clado II e outro se junta a cepas do clado II, além disso cepas do clado II se mostram distantes filogeneticamente de todos os clados. Pelo gene COX II é mantida divisão clássica dos clados, porém mostra clados II e III mais próximos entre si.

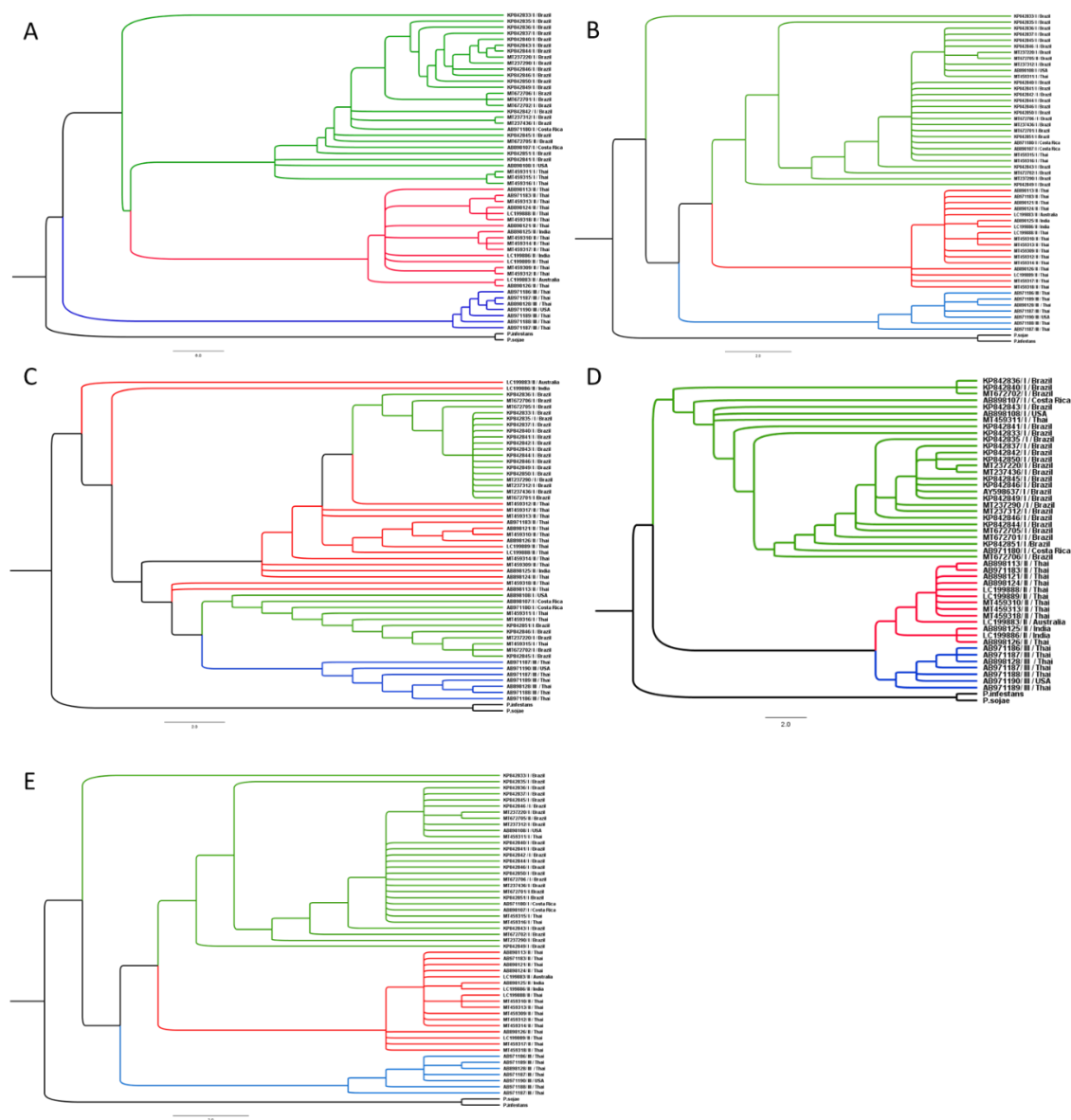


Figura 6. Análise de Máxima Parcimônia para os genes individuais. A- α -tubulina, B- β -tubulin, C - TEF-1 α , D por COX II, E por ITS. As diferentes cores dos ramos representam a divisão clássica: em verde são cepas clado I, vermelho clado II e em azul, cepas clado III.

Pela filogenia por Máxima Parcimônia a topologia da árvore se manteve, na ausência de COXII, divisão clássica dos clados, sendo clado I e II grupos irmãos e com maior distância filogenética do clado III (**Figura 7- A e B**).

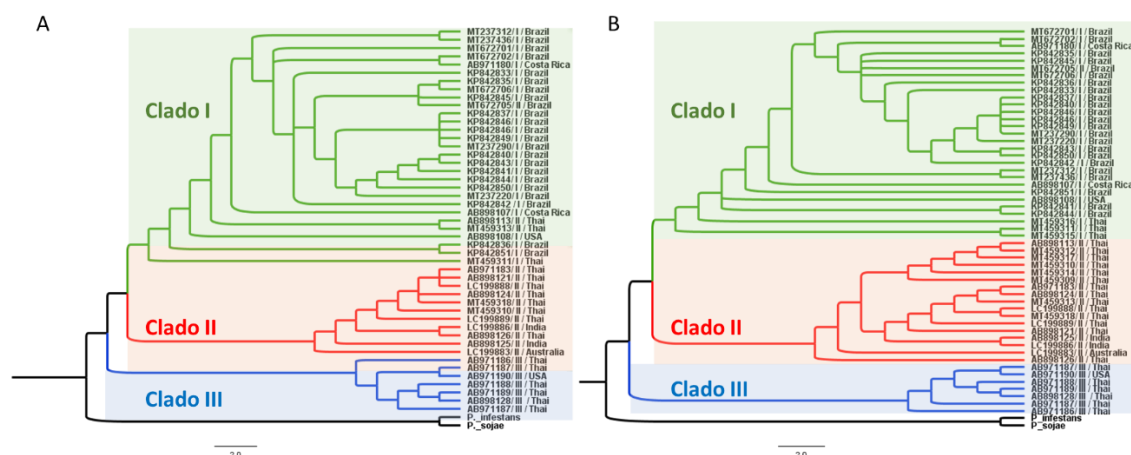


Figura 7. A - Máxima Parcimônia concatenada para os 5 genes. B- Máxima Parcimônia concatenada na ausência de COX II. As diferentes cores dos ramos representam a divisão clássica: em verde são cepas clado I, vermelho clado II e em azul, cepas clado III.

Discussão

Perspectivas das análises *unilocus*

Os novos genes alvos utilizados neste trabalho, α e β -tubulina, são genes codificantes de proteínas estruturais dos microtúbulos, que desempenham importantes papéis celulares. Apesar de mostrarem altas taxas de variações evolutivas entre os grandes grupos fúngicos, apresentam-se mais conservados entre organismos intimamente relacionados como mostra comparações intraespecífica (ZHAO et al., 2014).

Nosso trabalho mostra que, com base nesses genes, sustenta-se os clados para *P. insidiosum*, no entanto pela Bayseana e MP uma cepa brasileira se mostra divergente das demais representativas do clado (KP842833/ Eq02), sendo mais próxima do clado III. Com base na ML, pelo gene α -tubulina, apenas as cepas da Austrália e Índia, dentre as representantes do clado II, se mostraram divergente das demais ($Btp = 77,94$). Apesar da variação no agrupamento dos táxons dentre as cepas do clado I e II, todas as análises para estes dois genes, sustenta a maior divergência do clado III ($btp=95,9\%$ e $PP= 0,87$).

Esses resultados sugerem uma diferenças genéticas dentre isolados do Brasil clado I, contrapondo o que sugeriam as primeiras filogenias que mostrava não haver divergência genética nas cepas brasileiras como explicitado pelo gene ITS, que incluía as cepas utilizadas neste trabalho (PAZ et al., 2021) e outros que incluía cepas brasileira de diferentes regiões (AZEVEDO et al., 2012). Esses resultados corrobora com os estudos recentes, baseados em filogenia e tipagem molecular, que mostrou uma cepa brasileira,

isolado ambiental (não inclusa neste estudo) alocada no clado III, e pouco depois, descrita como a nova espécie críptica, *P. periculosum* (WEIBLEN et al., 2020; PAZ et al, 2021; MIRAGLIA et al., 2022).

A região da α -tubulina foi a mais divergente para cepas do clado III, o primeiro conjunto de primer desenhado não amplificou este clado a ponto de precisar degenerar um base do *primer* desenhado (Tabela 2*). De acordo com esse dado, o primeiro par de *primer* desenhado é sugerido como potencial alvo para diferenciar casos de pitiose dos dois agentes etiológicos, *P. insidiosum* (I e II) e *P. periculosum* (III), sem a necessidade de sequenciamento.

Outro importante alvo neste estudo, Tef-1 α , codificante do fator de alongamento da tradução, fator envolvido num processo celular bastante crítico, é um gene com pouca variação intraespecífica mas com altas taxas de variação entre espécies relacionadas, já sendo anteriormente avaliado como alternativa ao ITS-rDNA na identificação de espécies fúngicas (MIRHENDI et al., 2015). Neste estudo, este alvo não apresentou divergência entre os representativos do clado I e II, tanto na ML com na Bayseana (*btp*= 86,74% e PP= 1,0), no entanto, também evidencia a maior distância filogenética do clado III, com 100% de *btp* e probabilidade posteriori de 1,0. Esse resultado sugere que a região do Tef-1 α poderia ser um candidato para validação de um marcador de diagnóstico da pitiose e para futuros estudos de diferenciação entre *P. insidiosum* (Clado I e II) e a espécie descrita recentemente, *P. periculosum* (clado III). Este gene, apesar de não ser reconhecido como tal, foi validado, recentemente, como marcador no diagnóstico de infecções por outra espécies fúngicas patogênicas de mamíferos, causada por *Candida* spp. e fungos dermatófitos (MIRHENDI et al., 2015; PAKSHIR et al., 2020). Estudos comparativos envolvendo outros patógenos oomicetos e fungos devem ser realizados para validar esse marcador para diagnóstico da pitiose.

Para todas as análises aqui realizadas com a região parcial do gene codificante da subunidade II da enzima citocromo oxidase (COXII) corroboram para divisão clássica dos clados (*bootstrap* = 100% e PP=1), no entanto é único gene dentre os testados nesse trabalho, que sugere que o clado I é mais distante filogeneticamente dos demais e o clado II e III, grupos geneticamente mais íntimos. Além do mais, esse gene se diversifica dentre as cepas representativas do clado I, duas cepas brasileiras e uma da Costa Rica se separam das demais, nas três análises (*bootstrap*= 83,42% e PP= 0,65), evidenciando mais uma vez variação genética dentre as cepas americanas e especificamente dentre as brasileiras.

A região parcial COXII foi uma das primeiras regiões utilizadas para traçar filogenia intraespecífica de *P. insidiosum*, por ser uma região bastante variável, é eficiente para mostrar divergência intraespecífica e foi por ela que recentemente foi possível determinar divergências mais acentuadas dentro da espécie, como no trabalho que descreve a nova espécie críptica e também nos estudos com cepas ambientais na Tailândia que mostra isolados ainda não tipados, ou seja, que não se aloca nos clados classicamente descritos para espécie (APPAVU; PRAJNA; RAJAPANDIAN, 2020; MIRAGLIA et al., 2022).

A região ITS-rDNA, não codificante, além de ser usada como código de barras para detecção e diagnósticos de fungos e oomicetos, tem sido indispensável para traçar filogenia tanto inter quanto intraespecífica, e foi a primeira região gênica utilizada em análises filogenéticas de forma individual e em combinação com outras regiões, como COXII e a região gênica codificante da enzima 1,3- β -glucanase, que mostrava, até então, a divisão clássica dos três clados para *P. insidiosum* (AZEVEDO et al., 2012; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011d; KEERATIJARUT et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017; SCHURKO et al., 2003c). Neste trabalho, as três análises utilizando a região ITS sugerem maior proximidade genética entre clado I e II, sendo o clado III mais distante filogeneticamente.

Perspectiva da análise *Multilocus*

Na ausência do gene COXII as três análises filogenéticas evidenciam o mesmo cenário, cepas do Brasil, da Costa Rica, dos EUA e os recentes isoladas na Tailândia, representativos do clado I e, cepas Tailandesas, Indiana e a Australiana, do clados II, são dispostos como clados irmãos e pela topologia apresentada, se mostra mais recente que as cepas do clado III. O clado III, por sua vez, se encontra mais distante filogeneticamente dos demais, sustentado por alta taxa de *bootstrap* e elevada probabilidade *posterior*, resultados semelhantes aos demonstrados pelas primeiras filogenias traçadas para espécie, com os genes isolados ou em combinação (AZEVEDO et al., 2012; BOSCO et al., 2008; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; SCHURKO et al., 2003).

Outra evidencia dessas análises é a subdivisão do clado I, sustentada em todas as inferências, na ausência de COXII (PP=1,0 e 99,9% de *bootstrap*). A Bayesiana concatenada na ausência de COXII mostra um clado contendo duas cepas tailandesas e o outro se ramifica separando outras cepas tailandesas e estadunidenses de todas as

brasileiras e dos isolados da Costa Rica, indicando que, apesar do clado I se mostrar monofilético, elas apresentam divergência genética entre si (**Figura 5-B**).

Com a presença do gene COXII, manteve a topologia monofilética para espécie, no entanto, a representante Asiática deste clado neste estudo, se divergiu de todos os clados, além disso, essa análise deixou explícito maior diversidade para cepas do clado II: dividiu em dois subclados, um contendo apenas o isolado da Austrália (PP= 0,97), o outro subclado contendo cepas tailandesas e indianas, que também se divergem entre si, inclusive de mesma origem geográfica, sustentados por probabilidade *posteriori* alta (PP= 0,96 – 1,0), esses dados confirmam resultados mostrado em um estudo de 2011 que já evidenciava divergência entre as cepas Australiana das Indiana e tailandesas (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011b).

Estudos com abordagens filogenéticas mostraram que o gene COXII explicitou, desde 2011, a divergência entre os clados (AZEVEDO et al., 2012c; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011). Estudos recentes mostram que para além da divisão clássica da espécie, esse gene mostra novos clados filogeneticamente distintos desse já descritos, como aconteceu com cepas indianas analisadas, que até então eram todas agrupadas no clado II, mas estudo analisando novos isolados mostram esses isolados formando um novo clado (APPAVU; PRAJNA; RAJAPANDIAN, 2020).

Dessa forma, nossa análise concatenada mostra que não existe um consenso entre a separação clássica do clado I e II, no entanto, para todas as análises de combinação dos 5 genes aqui analisados, bem como todas as análises individuais, é consenso e sustentada por altas taxas de *bootstrap* e elevada probabilidade *posteriori* a distância filogenética do clado III dos demais isolados, corroborando para a nova classificação deste clado como uma espécie críptica (MIRAGLIA et al., 2022b). Além disso a topologia da árvore é alterada pela adição do gene COXII, evidenciando divergência cepas do clado I e II, nas análises Bayseana e ML, respectivamente.

Apesar dos representantes do clado III deste trabalho serem todos isolados de humanos, não foi observado uma relação clado/hospedeiro. Além disso, nossos resultados corroboram com os publicados recentemente e contestam a ideia de divisão dos clados conforme a origem geográfica do isolado, mostrando cepas do clado I sendo encontradas no continente asiático e cepas do clado III/ *P. periculosum* sendo isoladas nas Américas. Pode-se estabelecer que, conforme há um aumento de números de casos de pitiose e o

consequente aumento de estudos filogenéticos e de tipagem molecular desses isolados, maior divergência intraespecífica é explicitada.

Conclusão

Através de abordagens filogenéticas multigênicas por diferentes inferências evolutivas, a hipótese de maior divergência filogenética do clado III, bem como, este ser o precursor dos outros clados é confirmada e corrobora com o trabalho que o delimita uma nova espécie críptica, *P. periculosum*. As regiões gênicas da α e β -tubulina se divergem entre cepas representativas do clado I, destacando isolados que não se alocaram em nenhum dos clados clássicos. Nosso marcador α -tubulina é sugerido como alvo para diferenciar *P. insidiosum* de *P. periculosum* sem a necessidade de sequenciamento. Tef-1 α é sugerido como candidato a validação para marcador do diagnóstico da pitiose, além de também ser capaz de diferenciar *P. insidiosum* e a nova espécie críptica, *P. periculosum*, separando-as em dois clados bem sustentados. Vale ressaltar, portanto, que em todas as filogenias aqui traçadas, individualmente ou concatenadas, por diferentes análises evolutivas, foi observado que cepas do clado I e II são geneticamente relacionadas e o clado III mais distantes, além disso, as análises multigênicas entregam uma maior resolução na topologia da árvore, explicitando a importância das análises multilocus nas abordagens evolutivas.

Agradecimentos: à FAPESP, por ter concedido o Projeto Auxílio, processo nº 2018/24507-0 e à CAPES pela bolsa a aluna, processo Nº 88887.482449/2020-00.

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, 2012a.
- 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.
- 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, 2011.
- 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 2022a.

- 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.
- NCBI. NCBI BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: Abr. 2024.
- 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 homoplasy: 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.
- 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. Probing the Phylogenomics and Putative Pathogenicity Genes of *Pythium insidiosum* by Oomycete Genome Analyses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018a.
- 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.
- SMITH, J. Bayesian Phylogenetics using Markov Chain Monte Carlo. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(1), 147–155. 2005.
- 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. Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes. Em: [s.l.: s.n.]. p. 141–217.

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, 2020a.

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. 2022a.

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.

CAPÍTULO II

Novos marcadores AFLP para explorar variações genômicas em *Pythium insidiosum* e *Pythium periculosum*

Prado, AC¹; Garces HG²; Yamauchi, D¹; De Carvalho, JA²; Rodrigues, AM²; Pereira, DIB³; Gasparini, GC¹; Souza, DSM¹; Krajaejun, T⁴; Rujirawat, T⁵; Yurayart, C⁶; Bagagli, E¹; Bosco, SMG^{1,7}; Chechi, JL⁸.

¹ Setor de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paula, Brasil.

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brasil.

³ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Hospital Ramathibodi, Universidade Mahidol, Bangkok, Tailândia.

⁵ Centro de Pesquisa, Faculdade de Medicina, Hospital Ramathibodi, Universidade Mahidol, Bangkok, Tailândia;

⁶ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Kasetsart, Bangkok, Tailândia;

⁷ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paula, Brasil.

⁸ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Resumo

A pitiose é uma infecção granulomatosa crônica com prevalência em regiões de climas tropical, subtropical e que tem se estendido a regiões temperadas, cujo agente etiológico é *Pythium insidiosum*. A infecção ocorre por meio da penetração dos zoósporos, presentes no ambiente aquático, em tecido lesionado e pode causar lesão subcutânea, gastrointestinal, ocular e até mesmo atingir tecidos linfáticos e se disseminar. O grande desafio é o diagnóstico rápido e tratamento. A pitiose é facilmente confundida com lesões fúngicas, porém não responde aos antifúngicos. Na última década casos de pitiose têm aumentado drasticamente, concomitantemente, estudos genéticos têm explicitado cada vez mais divergências intraespecíficas para *P. insidiosum*. Técnicas de genotipagem, tem se mostrado acessível e eficiente para mapeamento do genoma na determinação de polimorfismo, como a AFLP (*Amplified-fragment-length Polymorphisms*). Nesse estudo, determinamos novos marcadores AFLP para o mapeamento genômico de isolados de *P.*

insidiosum e a nova espécie críptica *P. periculosum* de regiões endêmicas globais. Foi realizado uma análise AFLP simulada, utilizando 12 genomas completos de *P. insidiosum* de diferentes origens, disponível na base de dados do *GenBank* (NCBI) que foram digeridos *in silico* com as enzimas de restrição EcoRI e MseI, juntamente a um total de 256 combinações de duas bases seletivas (EcoRI+2 e MseI+2), a fim de se obter as melhores combinações de *primers* que indiquem polimorfismos entre os genomas para serem aplicados nos estudos *in vitro*. O número e o tamanho dos fragmentos foram utilizados para construir uma matriz de fragmentos e os dados foram visualizados utilizando mapa de calor gerado pelo *software Heatmapper* e posteriormente gerado um dendrograma que simula a relação intraespecífica para os genomas utilizados. As análises *in vitro* realizadas com 21 amostras de DNA de isolados de *P. insidiosum* representantes dos diferentes clados que serão submetidos aos marcadores selecionados, e os fragmentos visualizados e analisados por eletroforese capilar. Pelas análises *in silico*, determinamos 6 combinações de *primers* que geraram fragmentos de maior polimorfismo entre os genomas de *P. insidiosum* e pela comparação do padrão de fragmentos gerados virtualmente, determinamos previamente, a relação entre os clados. Além disso, os genomas analisados, apresentaram relações intraespecíficas diferentes das descritas até então, aproximando geneticamente alguns isolados do clado I e III, genótipos que até então apresentavam maior divergência genética. Os resultados *in vitro* (prévios) mostra diversificação dos isolados do Sul em relação aos isolados da região Sudeste e Nordeste do Brasil. Esses resultados implicam na caracterização genética mais profunda de isolados de regiões endêmicas do clado I, onde recentemente tem sido isolado clado III, e estes, por sua vez, demonstrando tanta divergência a ponto de se destacar como uma nova espécie, determinando então, um novo agente etiológico para pitiose, *Pythium periculosum*.

Palavras-chave: Padrão de restrição, pitiose, *Amplified Fragment Length Polymorphism*, análises *in silico*, marcador molecular, tipagem molecular.

Introdução

Pythium insidiosum é o oomiceto reconhecido como agente etiológico da pitiose. Os oomicetos são organismos semelhantes a fungos, sendo alguns saprófitos, decompositores de matéria orgânica, enquanto outros podem ser fitopatógenos bem agressivos, como o exemplo notório é *Phytophthora infestans*, responsável pela Grande

Fome da Batata na Irlanda no século XIX (JONES, 1909; THINES, 2018). *Pythium insidiosum* era descrito, até a última década, como sendo a única espécie do grupo capaz de infectar mamíferos, sendo problema de saúde humana em alguns países na Ásia (CAMPBELL, 1990; THIANPRASIT et al, 1996; PAL & MAHENDRA, 2014). Há 20 anos atrás foi traçada a primeira inferência evolutiva intraespecífica baseada na sequência de gene tradicionalmente usada no grupo para este fim, a espécie se mostrou dividida em três clados parafilicos, tendo alguma relação com a origem geográfica: o perfil genético denominado clado I composto principalmente por isolados que infectavam equinos no continente Americano, o clado II e o clado III em países asiáticos e Austrália (SCHURKO et al., 2003a, 2003b) e associados a infecções humanas na Índia e Tailândia (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022). Mais de dez anos depois foram traçadas novas inferências evolutivas concatenadas de dois genes, e os resultados foram corroborados com a primeira (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; AZEVEDO et al., 2012).

A pitiose é relatada predominantemente, em regiões tropicais e subtropicais (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022). A região sudeste asiática (principalmente a Tailândia) e o Brasil vinham sendo descritas como zonas endêmicas da doença no mundo, pois por muitos anos apresentavam maior incidência e prevalência da doença, sendo que, os casos de origem asiática são prevalentemente descritos em humanos enquanto no Brasil estão associados principalmente aos equinos (CHAFFIN et al., 1995; GAASTRA et al., 2010; SANTOS et al., 2014; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012). No entanto, nos últimos cinco anos esse cenário vem mudando. A doença que se concentrava em regiões de clima tropical tem se estendido para região temperada e atualmente os Estados Unidos apresentam o maior número de casos equinos de todas as áreas endêmicas até então (NGUYEN et al., 2021; MIRAGLIA et al., 2022; YOLANDA & KRAJAEJUN, 2022; WEIBLEN et al., 2020;).

Yolanda e Krajaejun (2022) descrevem que a espécie mais afetada pela pitiose em todo o mundo são os cavalos, seguidos de humanos e cães. Em países como Índia e Tailândia a pitiose representa um problema de saúde pública, já que os humanos são os principais afetados, enquanto Estados Unidos, Brasil e Austrália lideram com maior incidência de casos em cavalos. Os cães correspondem à terceira espécie mais afetada, e ocupa o segundo lugar nos EUA e Brasil. Outros países como Colômbia, Egito, Venezuela, Costa Rica, China, Uruguai, Papua, Nova Guiné, Japão, Israel, Espanha, México, Malásia, Coreia do Sul, Jamaica, Haiti, Mali, Nova Zelândia, Taiwan entram no

mapa da distribuição da pitiose, como ilustrado na figura abaixo (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022).

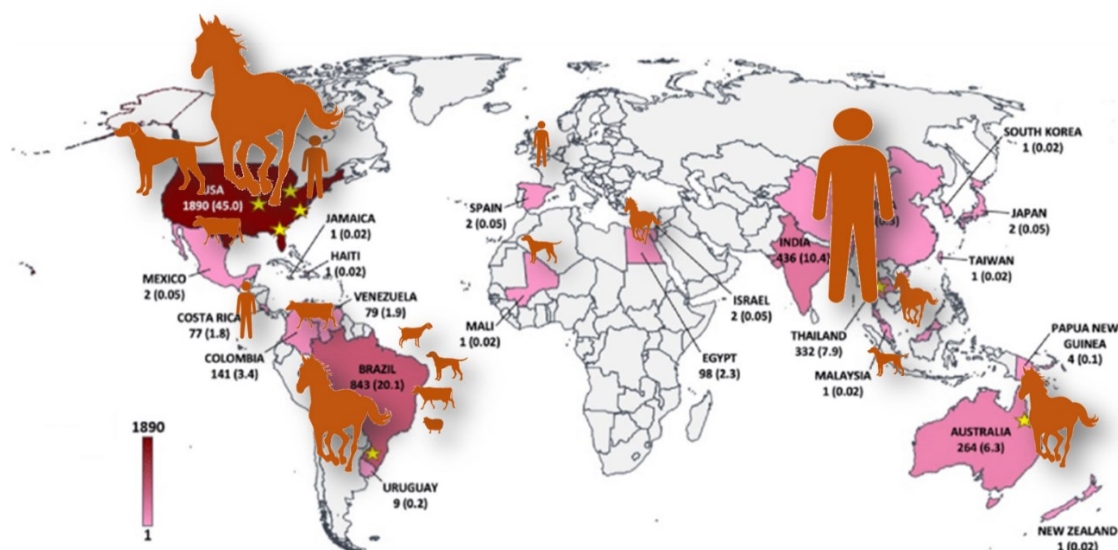


Figura 1. Distribuição global da pitiose e espécies mais afetadas. Adaptada de Yolanda e Krajaejun, 2022.

Em humanos observa-se mais frequentemente lesões oculares, seguidos por casos de lesões cutâneas/subcutâneas, forma vascular e disseminada. A ceratite por *P. insidiosum* tem tido um aumento sem precedentes, principalmente em países asiáticos, provavelmente devido à crescente investigação sobre o microrganismo por aspectos moleculares e à melhoria das modalidades de diagnóstico, já que, por se assemelhar clinicamente à ceratite fúngica, contribui para subnotificação da doença (GURNANI et al., 2021, 2022a, 2022b; VISHWAKARMA; BAGGA, 2023).

Nos equinos são observadas lesões ulcerativas granulomatosas com bordas irregulares contendo estruturas de coloração branco-amareladas com trajeto semelhante ao das hifas, denominados “*kunkers*”, os quais correspondem a uma reação imunológica muito intensa desencadeada pela degranulação de eosinófilos e mastócitos ao redor das hifas. Essas estruturas se desprendem facilmente da lesão, e pode servir como estrutura de dispersão no ambiente (MENDOZA & NEWTON, 2005). Em pequenos animais, a pitiose se expressa sob as formas gastrointestinal e cutânea e a doença é subdiagnosticada pela falta de suspeita clínica e diagnóstico especializado (TORRES NETO et al., 2020; PEREIRA et al., 2010; MACÊDO et al., 2015).

A principal preocupação em relação a doença e a rápida disseminação vascular podendo se disseminar no hospedeiro devido baixa resposta do patógeno a antifúngicos, sendo assim, a medida mais eficaz de tratamento é a debridação cirúrgica e nesse caso,

um diagnóstico rápido e preciso é imprescindível para melhora no prognóstico do paciente (CHAFFIN et al 1995; PERMPALUNG et al 2020; SRIDAPAN & KRAJAEJUN, 2022; YOLANDA & KRAJAEJUN, 2020).

Com a popularização e acessibilidade das técnicas moleculares e de estudos genômicos, têm se ampliado os métodos de diagnóstico preciso para o patógeno, mais que isso, tem permitido estudos mais complexos de distribuição e epidemiologia do patógeno. Estudos genômicos baseados em sequenciamento de DNA são extremamente relevantes para se entender a história evolutiva do patógeno, sua distribuição e possível disseminação. Nesse contexto, observamos que atualmente com a expansão da doença pelos EUA, bem como estudos para determinar a qual clado intraespecífico pertence o patógeno por lá encontrado, identificaram-se divergências genéticas suficientes para determinar uma nova espécie, composta pelo clado III, denominada *Pythium periculosum*. Essa divergência genética já era notada desde as primeiras filogenias que mostravam os cladogramas muito divergentes geneticamente dos demais cladogramas. Além disso, tem se percebido altas taxas de isolamento desse clado na América, inclusive no Brasil, onde antes era descrito apenas o clado I (SCHURKO et al., 2003).

Essa diversificação intraespecífica explicita a importância de estudos de tipagem molecular rápida e precisa para facilitar o entendimento da epidemiologia da pitiose. A filogenia é de extrema importância para se entender a história evolutiva do patógeno, no entanto estudos filogenéticos demandam tempo e recursos, ainda mais se envolve um grande número de genes ou DNA total. Assim sendo, vemos relevância na aplicabilidade de técnicas de tipagem molecular mais rápidas e acessíveis na identificação de variações intraespecíficas, aspecto extremamente importante para se entender a epidemiologia, distribuição e disseminação dos subclados de *P. insidiosum*.

Técnicas de tipagem molecular envolvem desde regiões gênicas específicas (RFLP - *Restriction fragment length polymorphism* e Multiplex-PCR) a padrão de restrição do genoma total. A técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) que se destaca pela sua rapidez de obtenção de dados aliado ao baixo custo e simplicidade, tornando a acessibilidade da técnica bastante alta. É utilizada principalmente na caracterização de diversos patógenos, inclusive em espécies fitopatogênicas dentro do gênero *Pythium* spp. (BOGALE et al., 2006; BORST et al., 2003; DE CARVALHO et al., 2020; 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 organismo, sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência genômica e tem sido amplamente empregado 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; SVELKOUL 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 *Sporotrix* 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).

Neste estudo objetivou-se fazer o mapeamento genômico pela seleção de novos marcadores AFLP visando variações intraespecíficas para os subclados de *P. insidiosum* em todo o mundo, com ênfase nas cepas brasileiras.

Metodologia

Iniciamos estes estudos com abordagem da AFLP *in silico* com o objetivo de identificar marcadores sugestivos de polimorfismos para os testes *in vitro*.

AFLP in silico

Para análise inicial, foram obtidos 12 genomas de *P. insidiosum* disponíveis na base de dados do NCBI, representativos dos três clados de origem diferentes, com detalhes na **Tabela 1**. Essas sequências foram analisadas *in silico* para prever marcadores AFLP de forma digital de comprimentos estabelecidos entre 50–500 bp. Os tamanhos dos fragmentos foram pré-determinados para otimizar a corrida de eletroforese posteriormente na AFLP padrão *in vitro*. As análises de AFLP *in silico* foram realizadas usando ISIF (*In Silico Fingerprinting*) (PARIS et al., 2010). Os genomas foram obtidos do *GenBank* e digeridos virtualmente com as enzimas de restrição EcoRI e MseI em um total de 256 combinações de duas bases seletivas (EcoRI+2 e MseI+2) para minerar um subconjunto de fragmentos seletivos. O número e o tamanho dos fragmentos foram usados para construir uma matriz de fragmentos e os dados visualizados usando mapas de calor. A análise de agrupamento de perfis AFLP *in silico* foram realizadas usando *Heatmapper* (BABICKI et al., 2016).

STRAINS	CLADO	SPECIES	SOURCE	ORIGEN	INSDC (WGS)	TOTAL LENGTH	BIOPROJECTS
ATCC 200269	I	<i>Pythium insidiosum</i>	Human	EUA	BCFN01	47.14Mb	PRJDB4251
CBS 573,85	I		Equine	Costa Rica	BCFO01	35.56Mb	PRJDB4251
CBS 101555	I		Equine	Brazil	BCFP01	48.86Mb	PRJDB4251
CDC B5653	I		Human	EUA	JRHR01	45.61Mb	PRJNA258227
MTPI 04	I		Equine	EUA	NAEV01	40.87Mb	PRJNA378184
CR02	II		Eviromental	Thailand	BCFR01	37.67Mb	PRJDB4251
MCC 18	II		Human	Thailand	BCFT01	34.54Mb	PRJDB4251
PI19	II		Human	Thaillad	BCFS01	34.5 Mb	PRJDB4251
PIS	II		Human	Thailand	BBXB01	53.24Mb	PRJDB3817
MCC 13	III		Human	Thailand	BCFM01	65.23MB	PRJDB4251
SIMI 4763	III		Human	Thailand	BCFU01	47.14MB	PRJDB4251
ATCC 64221	II		Equine	Australia	BCFQ01	37.82Mb	PRJDB4251

Tabela 1. Genomas da espécie de *P. insidiosum* recuperadas do banco de dados do genoma do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=114742>) para análise *in silico*.

Análises *in vitro*

Processamento e identificação molecular de novas amostras

Amostras clínicas (*kunkers* ou tecido) retiradas da lesão cutânea foram transferidas para tubos cônicos estéreis de 50 ml e lavadas, por pelo menos 3 vezes, em solução salina estéril contendo cloranfenicol (50 µg/ml) com agitação em vórtex. Parte foi destinada à cultura e outra parte encaminhada a extração do DNA.

Para as amostras submetidas à extração de DNA, empregou-se o kit comercial *NucleoSpin®Tissue* (Macherey-Nagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Reações de Nested-PCR foram realizadas para identificação do agente. A primeira rodada de PCR feita com os *primers* externos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') e ITS2P (5'-CCGCTTCACTCGCCGTTACT-3'), nas concentrações de 10 pmol/L, e a segunda rodada de PCR realizada com os *primers* internos Pi 1 (5'-TTCGTGGAACGGGACTGCT-3') e Pi 2 (5'-GCCGTACAACCCGAGAGTCATA-3'), nas mesmas concentrações, gerando um *amplicon* de fragmento de 105 pb, específico para *P. insidiosum* (Grooters & Gee, 2002). As reações de PCR foram realizadas em um Veriti Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA) com Go-taq Master Mix (Promega) e visualizadas em gel de agarose 1,5%.

Cultivo microbiológico e extração de DNA genômico para análises AFLP *in vitro*

Primeiramente foi realizada a cultura das amostras, os *kunkers* dos novos casos foram fragmentados, com lâmina de bisturi em +2 mm, e posteriormente semeados em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose 4%, incubados a 37°C e avaliados diariamente. Colônias semelhante a *P. insidiosum*, juntamente com avaliação microscópica, foram re-isolados em ágar Sabouraud dextrose. Após a obtenção da cultura pura, foi realizada a extração de DNA utilizando o *kit* descrito acima, seguindo o protocolo para cultura. Para garantir a confiabilidade da análise, foi feito tratamento do material genético com RNase (1ul de RNase A, [20 mg/mL]), posteriormente, avaliamos a qualidade do DNA por meio de espectrofotometria (NanoDrop, ThermoFisher), considerando a quantificação da concentração entre ~20-190 ng/uL, a pureza entre ~1,8 e 2,0 na relação A260/A280 e o perfil de absorção em 230 nm para verificar a presença de contaminantes, como fenol, etanol ou sais.

AFLP in vitro

Para estes estudos obtivemos DNA genômico de 21 isolados, sendo: 11 isolados do clado I, (região sudeste, sul e nordeste do Brasil), 5 isolados do clado II e 5 isolados do Clado III provenientes da Tailândia (**Tabela 2**). Parte das amostras foram processadas no Laboratório de Fungos ambientais e Micologia Médica, Universidade Estadual Paulista- Botucatu/SP - Brasil e parte realizada no *Pythiosis Lab, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University*, em Bangkok, Tailândia.

O DNA total para todas as amostras foi obtido diretamente de colônias cultivadas em ágar Sabouraud por sete dias seguindo o protocolo do *kit Fast DNA* (MP Biomedicals, Irvine, CA, EUA). A digestão do DNA, a ligação do adaptador, as amplificações seletivas e não seletivas serão realizadas *in vitro* conforme descrito anteriormente por Vos et al. com algumas adaptações (1995).

Resumidamente, 200 ng de DNA genômico de *Pythium insidiosum* foram digeridos por EcoRI e MseI (New England Biolabs, Ipswich, MA) e ligados aos adaptadores EcoRI e MseI simultaneamente (Integrated DNA Technologies, EUA) [64]. Uma amplificação pré-seletiva foi realizada com os iniciadores EcoRI + 0 e MseI + 0 [64]. AFLP fluorescente foi feito com primer EcoRI marcado com corante fluorescente 6-carboxifluoresceína (FAM; azul), com duas bases seletivas (5'-GAC TGC GTA CCA ATT C NN -3') e primer MseI não marcado com duas bases seletivas (5 '-GAT GAG

TCC TGA GTA A NN -3'). Quatro combinações diferentes foram escolhidas para avaliar o potencial de caracterização genética de isolados de *Pythium insidiosum* (descritas na tabela 3). Todos os oligonucleotídeos foram fornecidos pela Integrated DNA Technologies (IDT, San Diego, CA, EUA). Fragmentos de AFLP amplificados por PCR foram revelados por eletroforese capilar com um analisador genético ABI3100 juntamente com um padrão de tamanho interno LIZ500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil) nas condições descritas anteriormente. Os eletroferogramas independentes para cada combinação de primers seletivos foram importados no BioNumerics v7.6 (Applied Maths, St. Martens-Latem, Bélgica) e analisados para verificar a capacidade de reproduzir resultados com precisão. As distâncias genéticas pareadas foram calculadas usando o coeficiente de similaridade de Jaccard baseado em banda combinado com uma opção de "lógica difusa" no BioNumerics v7.6. Os dendrogramas foram criados de acordo com o método aritmético de média de grupo de pares não ponderados (UPGMA). O suporte à reamostragem de ramos foi realizado utilizando o coeficiente de correlação cofenética e o desvio padrão foi utilizado para expressar a consistência de um determinado cluster, que determina a correlação entre as similaridades derivadas do dendrograma e as similaridades da matriz.

O modelo de árvore geradora mínima (MST) foi utilizado para investigar as relações evolutivas entre todos os genótipos observados de espécies de *Pythium insidiosum*. Um modelo de árvore geradora mínima gera a árvore que conecta todas as taxons de tal forma que a distância somada de todos os ramos da árvore seja a mais curta possível (Vauterin et al, 2006). MSTs derivados de AFLP foram executados em BioNumerics v7.6 com dados AFLP após conversão em uma tabela de correspondência de bandas. Todas as figuras foram exportadas e tratadas no Corel Draw X8 (Corel, Ottawa, Canadá).

Análise de dimensionamento (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) foram utilizados como métodos alternativos de agrupamento, produzindo gráficos tridimensionais nos quais as entradas foram distribuídas de acordo com sua relação. Técnicas de dimensionamento foram executadas com dados AFLP após conversão em uma tabela de correspondência de bandas. A correspondência automatizada de bandas foi realizada em todas as amostras,

considerando o perfil mínimo de 5%, com otimização e tolerâncias de posição para seleção de bandas definidas em 0,10%. As configurações padrão foram aplicadas para PCA no BioNumerics v7.6, subtraindo a média dos caracteres (RODRIGUES et al, 2020). Todos as figuras foram exportadas e editadas no Corel Draw X8.

Nº	Clade	Sample ID	Origen	Nucleic Acid Conc. (ng/ul)	260/280
1	C1	EQ36	Brasil /sudeste	85,7	1,99
2	C1	Rs26	Brasil/ Sul	168,1	1,93
3	C1	Eq28	Brasil /sudeste	56	1,88
4	C1	EQ33	Brasil /sudeste	133,2	1,98
5	C1	Eq37	Brasil /sudeste	102,5	1,82
6	C1	Cão	Brasil /sudeste	307	1,8
7	C1	RS23	Brasil/ Sul	104,6	1,83
8	C1	Rs16	Brasil/ Sul	149,2	2,16
9	C1	EQ27	Brasil /sudeste	72	1,86
10	C1	EQ25	Brasil /sudeste	73,5	1,81
11	C1	EQ34	Brasil /Nordeste	98,7	1,8
12	C2	Pi033	Thailandia	147	1,91
13	C2	Pi054	Thailandia	183	2,00
14	C2	Pi055	Thailandia	191	2,06
15	C2	Pi087	Thailandia	137	1,84
16	C2	Pi106	Thailandia	142	2,11
17	C3	Pi057	Thailandia	125	2,19
18	C3	Pi075	Thailandia	178	2,05
19	C3	Pi083	Thailandia	19,2	2,07
20	C3	Pi089	Thailandia	46,9	2,14
21	C3	Pi094	Thailandia	39,7	2,12

Tabela 2. Isolados inclusos na análise AFLP in vitro.

Arvore filogenética para comparação de topologia

Análise Maximum Likelihood

Sequências nucleotídicas da subunidade II do citocromo oxidase, obtidas da base de dados *GenBank* (**Tabela 2**), foram alinhadas gerando uma matriz para os táxons avaliados na AFLP. O melhor modelo evolutivo foi gerado utilizando a *MrModeltest*, e realizada a filogenia no *software* MEGA X, usando método *bootstrap* com 5000 réplicas.

Análise Baysena

Para Análise Bayesiana (BA) foi determinado melhor modelo evolutivo utilizando o *MrModeltest* e realizada a análise no *MrBayes* 3.2.6 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) pelo servidor *online* CIPRES e inferidas as árvores MP por uma busca heurística, com adições aleatórias construídas em cada uma das 1000 réplicas de *bootstrap*. O suporte de

clado foi avaliado através de probabilidades posteriores (PP), obtidas a partir de um conjunto de 10.000.000 gerações de pesquisa *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC - SMITH, 2005) amostradas a cada 1000, após descartar 25% dos resultados iniciais como *burn-in*. E por fim, foi realizada inferência de Máxima Parcimônia e gerada a árvore consenso *strictu* pelo programa *Paup 4.0a*. As árvores geradas em todas as inferências foram editadas pelo *software FigTree* (v1.4.4).

Resultados e Discussão

AFLP *in silico*

O primeiro passo da nossa estratégia envolveu a caracterização *in silico* dos genomas do *P. insidiosum* depositados no NCBI, compreendendo membros clinicamente relevantes, bem como isolados ambientais. AFLP *in silico* foi usado para varrer locais de restrição para as enzimas EcoRI e MseI e criado um subconjunto de fragmentos com adição de bases seletivas (EcoRI+2 e MseI+2, tabela 3). As análises *in silico* resultaram em uma matriz com grande diversidade de fragmentos que variou de 0 a 98 nas 256 combinações testadas para os 12 genomas da espécie, através dessa matriz foi gerado o mapa de calor em que foi possível observar os *primers* que explicitam padrões que sugerem diferenças entre os genomas testados (**Figura 2**).

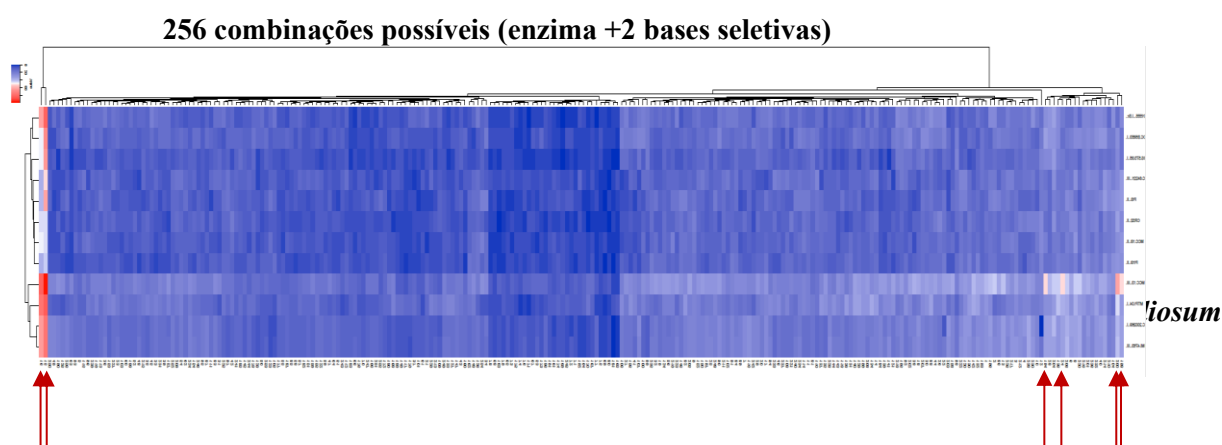


Figura 2. Mapa de calor gerado a partir da matriz de fragmentos resultantes da AFLP *in silico*. As linhas representam os genomas obtidos do NCBI e nas colunas cada uma das 256 combinações testadas. Vermelho indica combinações com maior número de fragmentos gerados (setas).

Pelas análises *in silico*, determinamos 6 marcadores que sugerem fragmentos de maior polimorfismo entre os genomas de *P. insidiosum* e selecionamos 4 para utilização neste trabalho (**Tabela 3**) e pela comparação do padrão de fragmentos gerados

determinamos, previamente, o agrupamento com base no padrão de restrição do genoma completo (**Figura 3**).

Combi	Enzima	Bases	Enzima	Bases	Marcadores AFLP
nações		seletivas		seletivas	
1	EcoRI	AA	MseI	GG	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AA -3 ' 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A GG -3 '
2	EcoRI	GA	MseI	TG	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C GA -3 ' 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A TG -3 '
3	EcoRI	GA	MseI	AC	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C GA -3 ' 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A AC -3 '
4	EcoRI	TT	MseI	TG	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C TT -3 ' 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A TG -3 '

Tabela 3. Conjuntos de marcadores selecionados a partir da análise *in silico* para análise AFLP *in vitro*.

Essas quatro combinações foram utilizadas nas análises *in vitro*, nos isolados indicadas na tabela 2.

Genotipagem

Com base no mapa de calor e o padrão de fragmentos de restrição para cada genoma analisado, foi possível construir uma relação prévia entre os 12 genomas obtidos no GenBank, dos três clados analisados (**Figura 3**).

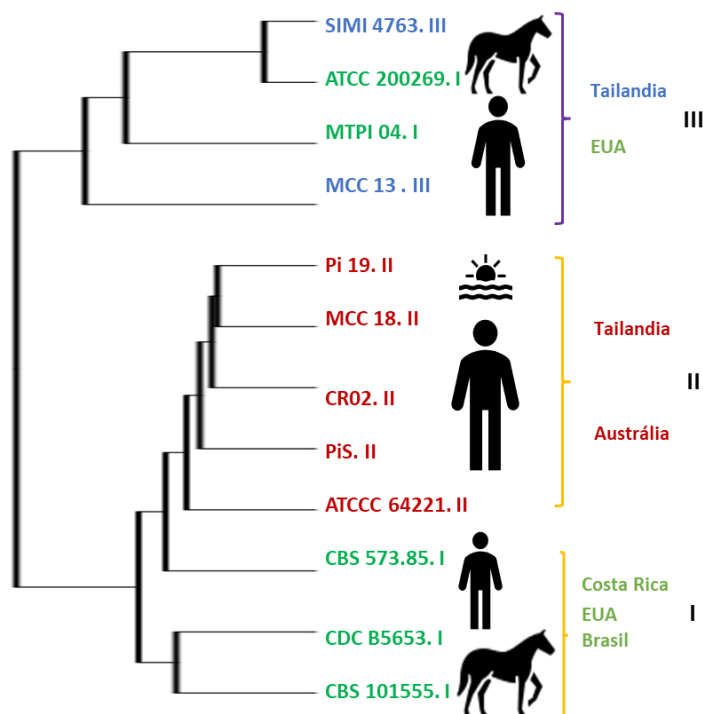


Figura 3. Dendrograma gerado pelo agrupamento hierárquico baseado na similaridade de fragmentos gerados pelas 256 combinações de marcadores AFLP testados. As diferentes cores dos ramos indicam a classificação clássica em relação ao clado (Multiplex PCR, rDNA): - clado I, - clado II, - clado III.

Com base nesses resultados prévios é possível verificar um padrão de relação intraespecífica diferente das análises filogenéticas descritas até então. Cepas Americanas (verde) que até então se apresentavam em um único clado agora se alocam em lugares distintos, parte próxima ao clado previamente tipado como III e outras próximas às cepas do clado II. As cepas dos EUA, se juntaram ao clado III da Tailândia, enquanto as cepas brasileiras e da Costa Rica se aproximam do clado II. A cepa da Costa Rica se mostra mais próxima a cepas do clado II. Enquanto em outro clado se juntam uma cepa norte americana e outra brasileira.

Nossa análise genotípica sugere que existem cepas descritas como clado I até então que são mais próximas do clado III. Este último apresenta maior divergência genética e maior divergência em todas as filogenias descritas até então. Isso sugere uma necessidade de caracterização a nível genômico mais profunda de isolados de regiões endêmicas do clado I, região na qual, recentemente, tem sido isolado cepas do clado III, e estes, por sua vez, demonstrando tanta divergência a ponto de se destacar como uma nova espécie, *Pythium periculosum*.

As análises genotípicas têm como base de agrupamento o padrão hierárquico de similaridade, não levando em consideração padrões evolutivos, apesar de, indiretamente, os agrupamentos sugerirem similaridade genética. Nesse sentido é interessante validá-la com inferências filogenéticas, a fim de entender a história evolutiva da espécie, de fato.

AFLP *in vitro*: Resultados Prévios - Cepas Brasileiras

Para testar então a hipótese de diversidade intraespecífica dentro do complexo *Pythium insidiosum* foram selecionados 4 marcadores AFLP representativos dos 3 clad. Por atrasos na liberação das amostras internacionais representativas do clado II e III elas ainda estão sendo processadas até o momento de escrita desta tese e, portanto, temos apenas a análise *in vitro* dos isolados brasileiros e esperamos estar com os resultados finalizados até apresentação deste trabalho, portanto seguem os resultados da AFLP para as amostras brasileiras.

Nas nossas amostras brasileiras temos isolados de três regiões relativamente distintas do Brasil: Sul, Sudeste e um isolado do Nordeste (em verde na tabela 2). A média de fragmentos gerados para as combinações de 1,2,3 e 4 foi de 55, 34, 28 e 22, respectivamente.

Dendrogramas AFLP típicos baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard estão representados na Fig. 5 (JACCARD, 1912). Estes apresentam 3 clados bem suportados com um nível de similaridade variando entre 63 e 100%, com valores cofenéticos elevados (>90) na maioria dos ramos. Em todas as combinações temos dois isolados de Pelotas, Rio Grande do Sul se separando dos demais (2 e 7). Outro isolados do Sul (8), se separa desses em três das 4 combinações testadas. Já o isolado do Maranhão, nosso representante do Nordeste (11) se agrupa com isolados do Sudeste em todas as combinações testadas.

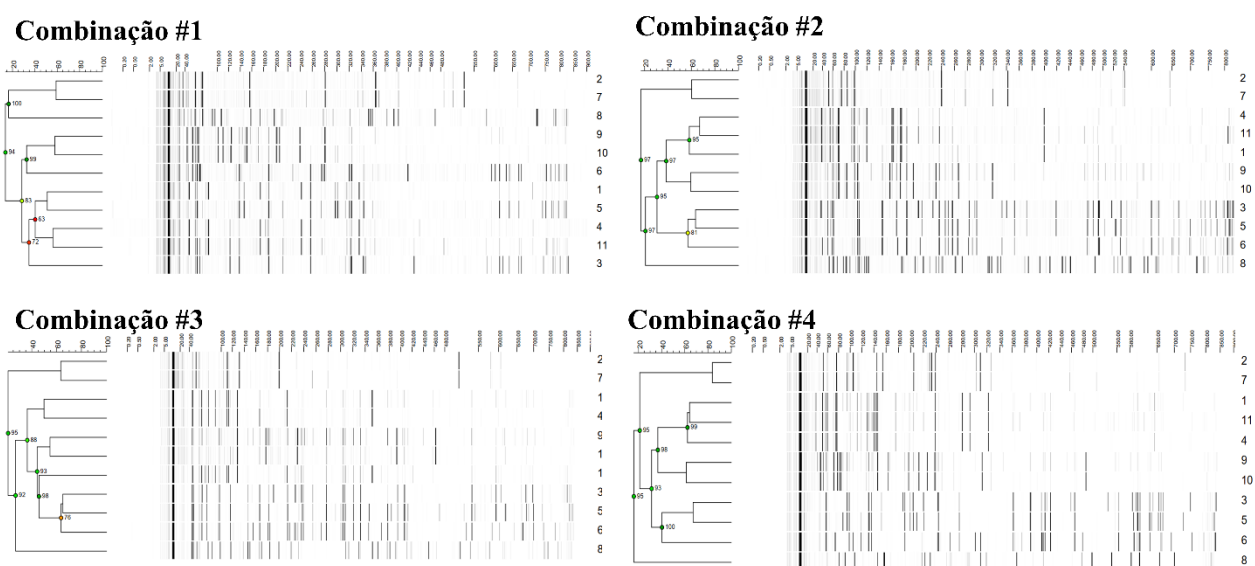


Figura 3. Dendrogramas das combinações 1 a 4 mostrando o perfil de agrupamento dos 11 isolados brasileiros de *Pythium insidiosum*. Os dendrogramas foram construídos pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e agrupamento UPGMA no software BioNumerics V7.6.

Os marcadores AFLP foram usados para gerar matrizes de distância genética pareadas com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, que foram submetidas a uma Análise de Componentes Principais (PCA) com BioNumerics v7.6 para permitir a visualização gráfica 3D das relações entre cada amostra de *P. insidiosum*. A Figura 4 mostra os gráficos de PCA para as combinações 1–4 e a distribuição de 11 isolados de *P. insidiosum* entre as três coordenadas concordadas com a árvore UPGMA. A análise mostrou claramente tanto o alto grau de agrupamento intraespecífico quanto a separação genética relativamente grande entre qualquer táxon individual (variação interespecífica).

Este agrupamento suporta a diversidade dentre as amostras brasileiras da região Sul em relação as demais, enquanto as do Sudeste e do Nordeste se agrupam em outro plano em todas as combinações avaliadas. Apesar dessas análises revelarem uma diversidade dentre as cepas brasileiras, esses resultados podem ser diluídos ao acrescentar as cepas do clado II e III, por apresentarem maiores divergência genômicas.

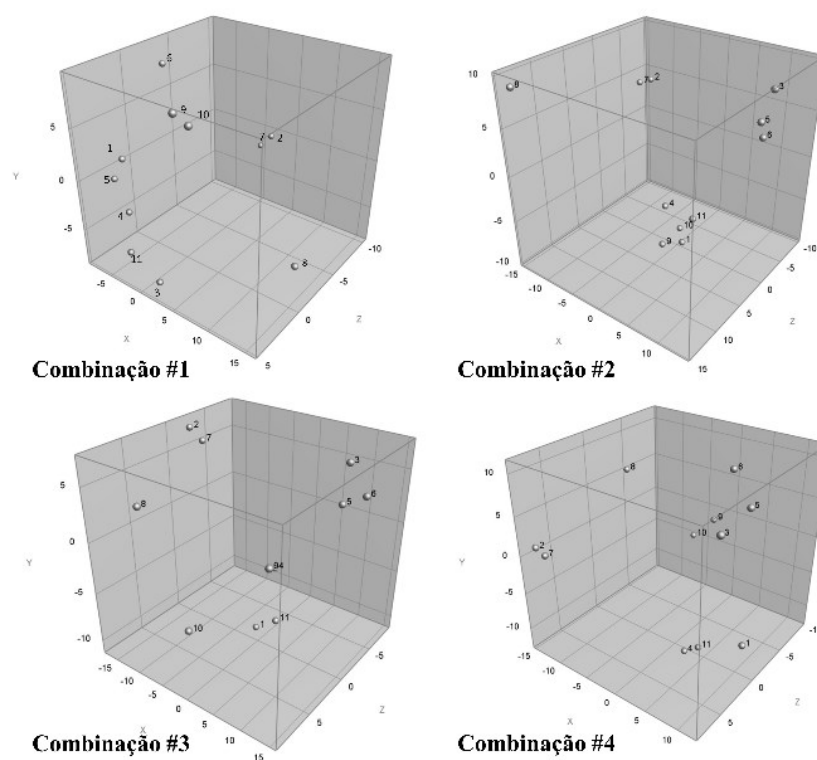


Figura 4. PCA das combinações 1 a 4. Os PCAs foram construídos no software BioNumerics v.7.6. e utilizados para demonstrar as correlações entre as 11 amostras de *Pythium insidiosum* utilizando as quatro combinações de marcadores. Os isolados são representados por circunferências numeradas.

Análise Filogenética COX II

Rodamos uma análise filogenética prévia afim de comparar com os resultados *in silico*. Estamos fazendo uma filogenia com nossa amostragem para comparar com resultados *in silico* para comparação com nossos resultados de genotipagem. Para as inferências filogenéticas foi utilizada uma matriz com 13 taxons da espécie e um grupo externo, *Phytophthora capsici*, com 698pb e desses, 131 sítios foram variáveis, sendo 52 informativos para as análises. Para análise de Máxima Verossimilhança o melhor modelo evolutivo encontrado foi *Tamura 3-parameter* com distribuição gama e sítios

invariáveis (T92+G+I) com parâmetro AICc = 3211.420 (*Akaike Information Criterion*) e valor de *Maximum Likelihood* (lnL) = -1576.618. A taxa estimada de substituição nucleotídica é explicitado na tabela abaixo (**Tabela 4**). As frequências dos nucleotídeos são A = 37,73%, T = 40,09%, C = 10,14% e G = 15,04%.

Tabela 4. Cada entrada é a probabilidade de substituição (r) de uma base (linha) para outra base (coluna). O padrão e as taxas de substituição foram estimados pelo modelo Tamura (1992). As taxas de diferentes substituições transicionais são mostradas em negrito e as de substituições transversais são mostradas em itálico.

De\Para	A	T	C	G
A	-	<i>11,41</i>	<i>2,89</i>	2,95
T	<i>9,88</i>	-	6,72	<i>4,28</i>
C	<i>9,88</i>	26,59	-	<i>4,28</i>
G	6,81	<i>11,41</i>	<i>2,89</i>	-

A análise Baysena teve diagnóstico de convergência médio de ESS (ESS= *Estimated Sample Size*) = 5926,27 e PSRF (*Potential Scale Reduction Factor*) = 1.0 para a matriz gênica, mostrando confiabilidade e robustez nas análises. Para ambas as inferências, a topologia de árvore foi semelhante e os clados sustentados com alta taxa de *bootstrap* e probabilidade *posteriori* (Figura 4).

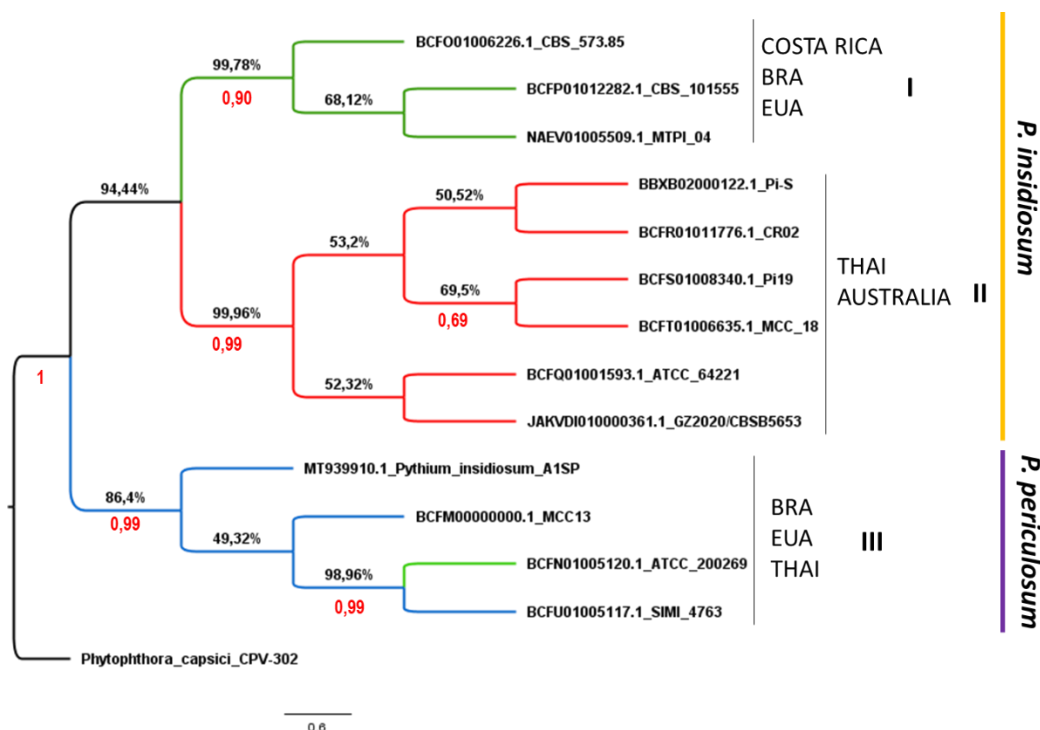


Figura 4. Árvore filogenética resultante das inferências evolutivas de isolados de *P. insidiosum* pelo gene parcial COX II. Os clados são sustentados pela probabilidade *posteriori* da Baysena (vermelho) e pela

porcentagem de *bootstrap* resultante da Máxima Verossimilhança (preto). As cores dos ramos indicam a tipagem clássica em relação ao clado: - clado III; - clado II; - clado I.

Nossas análises de genotipagem e inferências filogenéticas mostram a cepa ATCC 200269 alocada ao clado III. Este é um isolado de infecção da córnea em humano dos Estados Unidos e foi identificado em 2017 como sendo do clado I, por análise Multiplex PCR a partir de sequência de DNA ribossômico (KRAJAEJUN et al., 2021; RUJIRAWAT et al., 2017a).

Vale ressaltar que a PCR multiplex padronizada para tipagem da espécie leva em consideração a comparação do padrão de restrição de um único gene (RUJIRAWAT et al., 2017) e, apesar da validação dessa técnica, ela tem suas limitações. Na análise de AFLP aqui testada, fizemos uma abordagem de restrição que utiliza o genoma total e o resultado foi sustentado nas inferências filogenéticas com muita robustez (98,96 *btp* e 0,99 de PP), sugerindo que esta cepa seja mesmo do clado III, podendo ser classificada dentro da nova espécie descrita atualmente, *P. periculosum* (MIRAGLIA et al., 2022c). Esse resultado demonstra a importância de atualização de validação das técnicas de genotipagens baseadas em inferências evolutivas propriamente dita.

Segundo as últimas análises utilizando inferências evolutivas COXII e ITS e cladística por MALDI-TOF para o agente etiológico da pitiose, a análise de estrutura populacional mostrou que o clado anteriormente denominado III, é considerado uma nova espécie, *P. periculosum*, e esta, por sua vez, se subdivide em dois subclados, chamado então de clado III e clado IV, um deles contendo apenas cepas dos EUA. Já o subclado IV contém cepas tailandesas e uma brasileira de origem ambiental (MIRAGLIA et al., 2022; PAZ et al., 2021). Ainda neste trabalho de 2022, dentro dos isolados propriamente ditos *P. insidiosum*, temos outros dois suclados: o I, contendo cepas americanas (Brasil, Estados Unidos e Costa Rica), e o clado II que contém cepas do resto do mundo (MIRAGLIA et al., 2022).

Em nossas análises AFLP, duas cepas dos EUA, tipadas anteriormente como sendo clado I, se agruparam às cepas do clado III (MTP04 e ATCC200264). Uma dessas cepas ATCC200264 tipada pela multiplex PCR (RUJIRAWAT et al., 2017), se mostra agora sendo clado III pela inferência Baysena e de Máxima Verossimilhança de COXII.

A topologia para o clado III mostra-se subdividindo em dois, um ramo com a cepa do EUA (MCC13 e A1SP ambiental, considerada *P. periculosum*) e no outro a cepa

dos EUA, ATCC200269 e a tailandesa, resultados que corroboram o recentemente determinado para o clado III (MIRAGLIA et al., 2022).

Pela AFLP, os clados clássicos conhecidos como I e II formaram grupos monofiléticos, como já demonstrado nas inferências evolutivas publicadas até então (APPAVU; PRAJNA; RAJAPANDIAN, 2020; AZEVEDO et al., 2012; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; MAR HTUN et al., 2021; MIRAGLIA et al., 2022; RIBEIRO et al., 2017). Nossa análise filogenética sustenta esses resultados, mostrando as cepas classificadas como clado I e II, sendo mais próximos filogeneticamente. Além disso nossas análises evolutivas incluem genomas de isolados mais antigos depositados na base de dados, dos quais foi extraído genes COXII, e que não foram considerados nos trabalhos mais recentes, dessa forma vê-se a necessidade de se incluir nas novas análises o máximo de isolados para verificar a história evolutiva mais fidedigna do patógeno.

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.

IMWIDTHAYA, 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.